



HAL
open science

Rôle moléculaire de RPAP3 et fonction dans la physiologie de l'intestin

Chloé Maurizy

► **To cite this version:**

Chloé Maurizy. Rôle moléculaire de RPAP3 et fonction dans la physiologie de l'intestin. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT149 . tel-02383823

HAL Id: tel-02383823

<https://theses.hal.science/tel-02383823>

Submitted on 28 Nov 2019

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et biologie moléculaire

École doctorale CBS2 n°168 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : UMR5535- Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

Rôle moléculaire de RPAP3 et fonction dans la physiologie de l'intestin

Présentée par Chloé MAURIZY

Le 23 Novembre 2017

Sous la direction de Bérengère PRADET-BALADE

Devant le jury composé de

Béatrice ROMAGNOLO, directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

Didier PICARD, Professeur des universités, Université de Genève

Sabine COLNOT, directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

Édouard BERTRAND, directeur de recherche, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

Bérengère PRADET-BALADE, chargé de recherche, Centre de Recherche de Biochimie

Macromoléculaire, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Président

Co-encadrant

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier Béatrice Romagnolo, Sabine Colnot et Didier Picard, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'examiner mes travaux de thèse.

Merci à La Ligue nationale contre le cancer, pour le financement de mes quatre années de thèse,
Merci aux plateformes RHEM, MRI, MGC et RAM.

Merci à toi, Édouard pour m'avoir accueilli et fait confiance sur ces projets, et merci pour tes encouragements, par contre, je t'attends toujours pour le ping-pong

Bérengère, durant ma thèse tu m'as toujours poussé vers l'avant, suscitant ma curiosité et me poussant dans mes retranchements pour aller chercher toujours le meilleur que je pouvais donner, tu m'as incité à participer aux congrès, aux formations en insistant bien sur celle d'anglais, j'ai bien compris que mon anglais ne te plaisait pas... tu m'as incité aussi à participer au programme de mentorat « Femmes & Sciences », mais je pense que ce n'était pas vraiment la peine, une mentor j'en avais déjà une, Toi.
Merci pour ta confiance, ton estime, ton savoir, ta curiosité communicative, ta gentillesse et ton amour du chocolat... Communicatif lui aussi.

Merci à la Familia BEBR, et oui cette double équipe fonctionne parfois plus comme une famille que comme une équipe avec ses bons et ses mauvais côtés, mais qui sait bien vous accueillir et vous intégrer.

Merci à tous pour vos conseils, votre gentillesse, et vos bêtises, nos parties de rire...

Les après midis de CLAB étaient plus sympa avec vous les filles, Marion, MC, Flo ☐.

Xavier, alala, merci pour tes musiques, ta joie de vivre (sauf quand t'as pas dormi à cause d'Abel, mais il est trop mimi tu ne peux pas lui en vouloir) et tes blagues toujours très drôle .. ciao ciao,

Vivi et Alja, mes deux petites choupi, la vie au labo est plus rigolote avec vos accents chantant, Alja et son lapin à la moutarde ... , Houda, ma formatrice, ma version algérienne, Adham et ses cascades, Claire notre dernière recrue mais pas des moindre, l'équipe des lève-tôt celle de Rémy, celle des lève-tard celle d'Édouard, mais aussi Fred et Sylvie,
la devise de l'équipe « toute occasion se fête » donc des pots en veux tu en voilà Une vie bien animée, vous allez me manquer !

Je souhaite aussi remercier, toutes les personnes qui m'ont aidé sur ces projets :

l'équipe de Philippe Jay, et particulièrement François Gerbe, pour le temps d'écoute et les conseils pratiques

Mon équipe d'adoption, évidemment merci à Michael Hahne et en particulier Conception, Béné, Valérie, Sophie qui m'ont aidé en salle de dissection , grâce elles le temps passait plus vite et c'était plus « sympa » d'être enfermé dans ce petite salle ...

Le comité ZPB, une fine équipe qui a beaucoup de mérite pour le travail lors de la fameuse contamination de notre animalerie, grâce à elle le projet « Spaghetti-Whisky » n'a pas coulé et a pu redémarrer plus rapidement que prévu, ce fut une année difficile, merci à elles pour tous leurs conseils également, sur les schémas d'accouplement etc....

L'équipe de la ZEFI (Sarah , Vera, et bien sur Marina mon binôme de choc, une équipe dynamique et serviable et adorable avec qui travailler est un plaisir , je n'oublierai pas non plus l'élection Miss ZEFI (petit clin d'oeil à Juliette).

On ne peut pas évoquer la fille Couderc sans la mère, Merci à Françoise qui se bat entre autres avec les diverses administrations pour que les doctorants aient leur salaire, je crois que je te dois beaucoup de boîtes de chocolat, Merci à Sarah et Lysiane aussi pour leur gentillesse

Delphine, ma mentor du programme « Femmes & Sciences », merci pour tes conseils et pour les cours de yoga.

Merci à tous les personnes de l'IGMM parties ou encore présentes avec qui j'ai partagé de super moments qui ont rendu plus agréables ces années de thèse, les pots des thésards, l'organisation des colloques, la team sport avec Mahdi, les goûters d'anniversaire mais pour leur ouverture à la discussion scientifique

Ma petite Yousra de la curly team, en qui j'ai trouvé une véritable amie que je peux soudoyer en tomates du jardin bio de Serge... « the beautiful ... in London » .

Enfin merci aux personnes extérieures à l'institut mais qui ont été d'un soutien moral indéniable ; mes amis ceux qui sont ici mais aussi ceux qui sont là bas ... et évidemment toute ma famille, mes parents qui ont cru en moi quand j'y croyais plus, ma « petite » fratrie DEC3, je n'ai pas de mots pour vous remercier de nos moments « soupape » pendant ces quatre années de thèse, et finalement Morgan, mon soutien de tous les jours pour me faire retrouver le sourire quand je l'avais perdu et qui supporte mes discours sur la nouvelle interaction que j'ai trouvé ou les détails de mes dissections !

Merci à tous ceux que j'ai pu oublié dans ces remerciements ... la liste n'est pas exhaustive.

Table des matières

I.	INTRODUCTION	10
A.	La protéine chaperonne HSP90	11
1.	Généralités.....	11
2.	La structure d'HSP90	11
3.	Cycle de la protéine chaperon HSP90	13
4.	Régulation des fonctions d'HSP90 par ses co-chaperons	17
5.	Les différents substrats et les co-chaperons « adaptateurs »	21
6.	Rôles dans l'organisme.....	23
B.	Le complexe R2TP, co-chaperon d'HSP90.....	27
1.	Découverte du R2TP	27
2.	Structure et mode de fonctionnement du R2TP	29
3.	Les substrats du complexe R2TP	40
4.	Modèle général d'action du complexe R2TP	55
5.	Les protéines PIH-like et RPAP3-like.....	57
6.	HSP90, les RUVBL et le R2TP dans le cancer.....	60
C.	L'intestin comme organe d'étude de la prolifération	61
1.	Le rôle de l'intestin.....	61
2.	Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal	65
3.	L'épithélium intestinal, une régénération continue	69
4.	Les grandes voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le maintien de l'homéostasie intestinale.....	73
5.	Le cancer colorectal (CRC).....	81
D.	Objectifs et déroulement de la thèse	91
1.	Objectif principal : RPAP3 pourrait-il être une cible thérapeutique des cancers colorectaux ?.....	91
2.	Développement de modèles murins d'inactivation de <i>RPAP3</i> et, conduite des expériences sur les souris.....	91
3.	Développement d'un sujet connexe : le rôle du domaine C-terminal de RPAP3.....	93
II.	Résultats.....	94
A.	Rôle de RPAP3 dans l'épithélium intestinal et la tumorigénèse	94
1.	Introduction.....	94
2.	Résultats.....	96
B.	Mise en évidence d'un nouveau complexe tissu spécifique, le R2SP, apparenté au complexe R2TP.....	120
1.	Introduction.....	120
2.	Résultats.....	121

III.	Discussion.....	181
A.	Caractérisation de la fonction du domaine C-terminal de RPAP3.....	181
B.	Mise en évidence d'un nouveau complexe tissu-spécifique, le R2SP, apparenté au R2TP 184	
C.	Ciliogenèse motile et les complexes apparentés au R2TP.....	185
D.	Rôle de RPAP3 dans le maintien des cellules prolifératives de l'épithélium intestinal et de la voie Wnt.....	185
E.	Rôle de <i>RPAP3</i> dans l'épithélium du côlon.....	187
F.	Régénération du l'épithélium intestinal après l'invalidation de <i>RPAP3</i>	188
G.	La perte d'une copie de <i>RPAP3</i> favoriserait la tumorigenèse.....	188
IV.	Perspectives.....	190
A.	R2TP, complexes apparentés R2TP-like et ciliogenèse.....	190
B.	Rôle du R2TP dans d'autre tissus.....	190
V.	Bibliographie.....	192

Liste des abréviations

aa : acides aminés

ADP : Adénosine DiPhosphate

AHA1 : Activator of Hsp90 ATPase protein 1

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor;

AOM : AzOxyMéthane

APC : Adenomatous Polyposis Coli

apo = apoenzyme

AR : Androgen Receptor;

ARN : Acide RiboNucléique

Arp5 : Actin-related protein 5

Arp8 : Actin Related Protein 8 Homolog

ASCL2 : Achaete-Scute Complex-Like 2

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATPase : enzyme catalysant l'hydrolyse de l'ATP

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BRAF : Serine/threonine-protein kinase B-raf

BRG1 : Brahma-Related Gene-1(BAF)

CAF : Cancer Associated Fibroblaste

CAM : Cancer Associated Macrophages

CBC : Crypt Base Columnar

CBF1 : Centromer Binding Factor 1

CBP : CREB Binding Protein

CCDC103 : Coiled-Coil Domain-Containing protein 103

CD8 : Cluster Diffenciation 8

CDC23 : Cell Division Cycle protein 23 homolog

Cdc37 : Cell division cycle protein 37

CDC4 : Cell Division Control protein 4

CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4

cDNA : complementary DNA

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CIN : Chromosome INstability

CMS : Consensus Molecular Subtype

CP4 : Cellules en Position +4

CRC : Cancer ColoRectal

Cre : Causes recombination

CREB : C-AMP Response Element-Binding

cryoEM : cryo-Electronic Microscopy

CS : CHORD et SGT

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

CSL : CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1

CTD/ C-ter : C-Terminal Domain

CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12

DKC1 : dyskérine

DKK1 : Dickkopf homologue 1

DNA : DesoxyriboNucleic Acid

DNAAF2 : Dynein Axonemal Assembly Factor 2

DNA-PKc : DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit

Dsh : Dishevelled

DSL : Delta/Serrate/Lag-2

DSS : Dextran Sulfate Sodium

DYX1C1 : Dyslexia Susceptibility 1 Candidate Gene 1 Protein

EFTUD2 : Elongation factor Tu GTP-binding Domain-containing protein 2

EGF : Pro-Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase;

EphB : EphrinB

ER α : Estrogen Receptor- α ;

FAP : Familial Adenomatous Polyposis

FBL/Fib : Fibrillarine

FFL : Firefly Luciferase

FKBP : FK506-Binding Protein

Fz : Frizzled

GAR1 : Glycine- and Arginine-Rich ribonucleoprotein 1

GR : Glucocorticoid Receptor

GSK3- β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta

HAP1 : Haeme Activator Protein 1

hBcd1 : human Box C/D snoRNA protein 1

HCK : Haemotopoietic Cell Kinase

HCV : Hepatitis C Virus;

HE : Hématoxyline-Eosine

HEK293 : Human Embryonic Kidney cells 293

HeLa : Henriette Lacks

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HES : HairyEnhancer of Split

HGF : Hepatocytes Growth Factor

HIF : Hypoxia-Inducible Factor

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha

HNF4A : Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

HOP : Hsp70-Hsp90 Organizing Protein

HSF1 : Heat Shock Factor 1

HSP : Heat Shock Protein

IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2

IL-6 : InterLeukine 6

ImoPA : Ingénierie moléculaire et Physiopathologie Articulaire

IP : ImmunoPrécipitation

IRS2 : Insulin Receptor Substrate 2

KO : Knock Out

KOMP : KnockOut Mouse Project

LEF : Lymphoid Enhancer Factor

LGR5 : Leucine rich repeat containing G protein coupled Receptor 5

LRIF1 : Ligand-dependent nuclear Receptor-Interacting Factor 1

LRP5/6 : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6
LRR : Leu-Rich Repeat
LUMIER : luminescence-based mammalian interactome mapping
MD ou M : domaine central d'HSP90
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MR : Mineralocorticoid Receptor;
MSI : MicroSatellites Instability
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
N : Nucleoprotein (figure 6)
NAF1 : Nuclear Assembly Factor 1 ribonucleoprotein
NALP, NACHT : LRR and PYD domains-containing protein
NECD : Notch ExtraCellular Domain
NF κ B : Nuclear Factor-kappa B
NICD : Notch IntraCellular Domain
NLR : Nucleotide-binding LRR;
NMD : Nonsense Mediated Decay
NOD1: Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1;
NOP : Nucleolar Protein
N-ter / NTD / N : N- DomainTerminal
NUFIP1 : Nuclear Fragile X mental retardation-Interacting Protein 1
OLFM4 : Olfactomedin-4
PAS : Periodic Acid Schiff
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pi : Phosphate inorganique
PIH : Protein Interacting with HSP90
PIH1D1 : PIH1 Domain Containing Protein 1
PIH1D2: PIH1 Domain Containing Protein 2
PIH1D3 : PIH1 Domain Containing Protein 3
PIKK : Phosphatidylinositol-3 Kinase related Kinases
Pol II : ARN Polymérase II
PP5 : Protein Phosphatase 5

PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α

PPIase : Peptidy-Propyl cis-trans Isomerase

PR : Progesterone Receptor

PRF : Pseudomonas Resistance and Fenthion sensitivity

Prp31 : Pre-mRNA-processing factor 31

PRPF8 : Pre-mRNA-Processing-splicing Factor 8

PTM : Post Translational Modification

PXR : Pregnane X Receptor;

R2SP : RUVBL1 RUVBL2 SPAG1 PIH1D2

R2TP : Rvb1 Rvb2 Tah1 Pih1

RL : Renilla Luciferase

ROS : Reactive Oxygen Species

RPAP3 : RNA Polymerase II Associated Protein 3

Rpb1 : RNA polymerase II subunit B1

RPS2 : Resistance to Pseudomonas Syringae 2

RUVBL 1 / 2 : RuvB like AAA ATPase 1 / 2 (Rvb 1/ 2 Tip48/Tip49 p50/p55)

S.c : Saccharomyces cerevisiae

SAGA : Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase

SHQ1 : Small nucleolar RNAs of the box H/ACA family Quantitative accumulation

SILAC : Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture

SMARCA4: SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, member 4 (BRG1)

SMN : Survival MotoNeuron

snARN : small nuclear ARN

SNF2 : Sucrose NonFermenting 2

snoRNP : small nucleolar Ribo-Nucleo-Protein particles

snRNP : small nuclear Ribo-Nucleo-Protein Particles

SNRNP200 : Small Nuclear Ribo-Nucleo-Protein U5 Subunit 200

SNU13 : Small NUClear riboprotein 13 (15.5K)

SPAG1 : SPerm associated AntiGen 1

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TA : Transient Amplifying compartment
TACE : TNF- α ADAM metalloprotease Converting Enzyme
Tah1 : TPR containing associated HSP90 protein
TAU : Microtubule-associated protein tau
TCF : T-Cell Factor
Tel2 : Telomer length regulation protein 2
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TERT : TELomerase Reverse Transcriptase
TGF β : Trasnforming Growth Factor beta
TIC : Tumor Inducing Cells
TNF : Tumor Necrosis Factor
TOM70 : Translocase of Outer Membrane 70 kDa.
TPR : TetratricoPeptid Repeat
TRAP1 : TNF Receptor Associated Protein 1
Treg ; lymphocytes T régulateurs
TRRAP : Transformation/Transcription Domain Associated Protein
TSC : Tumor Suppressor Complex
Tti1 : TELO2-interacting protein 1 homolog
Tti2 : TELO2-interacting protein 2 homolog
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Vil : Villine
WDR92 : WD Repeat-containing protein 92
Wnt : Wingless/T-Cell
ZNHIT3 : Zinc finger HIT domain-containing protein 3
ZNHIT6 : Zinc finger HIT domain-containing protein 6 (BCD1)

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de la structure d'HSP90	12
Figure 2: Représentation du cycle ATPasique responsable des changements de conformation du dimère HSP90.	15
Figure 3 : Représentation de l'activation par HSP90 des récepteurs aux glucocorticoïdes avec l'intervention des co-chaperons.	16
Figure 4 : Représentation des régulations du cycle d'HSP90 par ses co-chaperons.	19
Figure 5 : Représentation des sites de liaison connus de quatre co-chaperons d'HSP90 chez <i>S.cerevisiae</i>	20
Figure 6 : Représentation de la liste non exhaustive des clients d'HSP90	22
Figure 7 : Schéma des voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale	25
Figure 8 : Représentation schématique du complexe R2TP chez l'homme et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Figure 9 : représentation schématique des protéines composant le R2TP chez l'homme et chez <i>S.cerevisiae</i>	30
Figure 10: Représentation de la structure d'un dimère de Rvb1: Rvb2 chez <i>Chaetomium thermophilus</i>	35
Figure 11 : Schéma de la structure du complexe Ino80 chez <i>S.cerevisiae</i>	36
Figure 12 : représentation schématique du rôle de Rvb1 et Rvb2 dans l'assemblage du complexe INO80	37
Figure 13 : Représentation de la structure à basse résolution du complexe R2TP chez <i>S. cerevisiae</i> .	38
Figure 14 : Représentation des ARNs à boîtes C/D (A) et à boîtes H/ACA (B)	41
Figure 15 : Structure des particules à petits ARNs nucléolaires à boîte C/D humain	44
Figure 16: Modèle d'assemblage des petites particules ribonucléiques non codantes à boîtes C/D (snoRNP C/D).	45
Figure 17 : Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA	48
Figure 18 : Modèle d'assemblage des sous unités de l'ARN polymérase II	51
Figure 19 : Modèle d'interaction entre le complexe R2TP, HSP90 et TEO2	53
Figure 20 : Schéma représentant les clients d'HSP90 dépendant du R2TP	54
Figure 21: Modèle général d'assemblage des complexes macromoléculaires par le R2TP	56
Figure 22 : Structure des protéines RPAP3-like et PIH-like (issu du manuscrit n°2)	58
Figure 23: Modèle d'assemblage des dynéines.	59
Figure 24 : Photo du tractus digestif d'une souris RPAP3 ^{+/+} .	61
Figure 25 : Image de l'épithélium de l'intestin grêle (a) avec les villosités et les cryptes, et en (b) image de l'épithélium au niveau du côlon.	63
Figure 26: Coloration à l'Hématoxyline-Eosine (panneau HE) et à l'Acide Périodique de Schiff (panneau PAS) de coupes d'épithélium intestinal de souris.	64
Figure 27 : Représentation schématique des types cellulaires connus de l'épithélium intestinal	67
Figure 28: schéma de l'organisation des cellules dans l'épithélium de l'intestin grêle.	71
Figure 29: Coupe de duodénum de souris RPAP3 ^{+/+}	72
Figure 30 : Schéma descriptif du mode d'action de la voie Wnt canonique.	74
Figure 31 : Invalidation de TCF4 dans l'épithélium intestinal.	76
Figure 33 : Séquence des mutations conduisant à la carcinogénèse colorectale	83
Issue de (Jones et al., 2008)	83
Figure 34 : Classification des sous-types de cancer colorectal	84
Figure 35 : les 2 grandes modèles de tumorigénèse intestinale	89
Figure 36 : Représentation des interactions au sein du R2TP au cours de l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D	182
Figure 37 : Assemblage des complexes macromoléculaires par le R2TP	183

Liste des figures de la partie « Résultats » :

A. Rôle de RPAP3 dans l'épithélium intestinal et la tumorigénèse (page 94)

Figure 1. RPAP3, a core component of the R2TP, is strongly expressed in dividing cells from the intestinal epithelium

Figure 2. Murine RPAP3 alleles and their viability

Figure Supplemental 2

Figure 3. Invalidation of RPAP3 induces a quick destruction of the intestinal epithelium

Figure Supplemental 3: Invalidation of RPAP3 induces a quick destruction of the intestinal epithelium, which compromises the survival of animals

Figure 4. Invalidation of RPAP3 compromises the CBC and TA cells.

Figure 4 supplemental: Invalidation of RPAP3 compromises the CBC and TA cells.

Figure 5. Invalidation of RPAP3 does not affect Paneth cells not β -catenin staining

Figure 6. RPAP3 prevents intestinal tumorigenesis by genetic induction

Figure 7. RPAP3 prevents intestinal tumorigenesis by AOM/DSS induction

B. Mise en évidence d'un nouveau complexe tissu spécifique, le R2SP, apparenté au complexe R2TP (page 120)

Figure 1. Solution structure of the C-terminal domain of human RPAP3

Figure 2. RPAP3-Cter interacts with RUVBL1/2 hexamers

Figure 3. The RPAP3 C-terminal domain interacts with R2TP clients via RUVBL1/2 multimers.

Figure 4. RPAP3-like and PIH1-like proteins interact with each other

Figure 5. Identification of R2TP-like complexes.

Figure 6. Identification of PIH1D2 partners

Figure 7. The R2SP complex promotes the stabilization of its clients and the assembly of liprin- α 2 complexes

I. INTRODUCTION

A. La protéine chaperonne HSP90

1. Généralités

La protéine chaperonne HSP90 (Heat Shock Protein 90) a été mise en évidence dans la réponse au choc thermique mais il s'avère qu'elle est exprimée de façon constitutive dans les cellules en condition homéostatique (Ritossa, 1996). Chez les bactéries, il n'y a qu'un seul gène codant pour HSP90, alors qu'il y en a deux chez *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*). Chez les mammifères, on compte deux isoformes cytoplasmiques : HSP90 β (Hsc82 chez *S.c.*) qui est exprimée de manière constitutive et HSP90 α (Hsp82 chez *S.c.*) qui est inductible en condition de stress, ainsi que deux autres paralogues d'HSP90 : TRAP1 au niveau de la mitochondrie (Leskovar et al., 2008) et Grp94 dans le réticulum endoplasmique (Frey et al., 2007). Le fait d'avoir des localisations différentes dans la cellule suggère que ces isoformes de HSP90 ont des fonctions différentes.

Contrairement aux autres chaperons, HSP90 assure les étapes tardives du repliement des protéines substrats (appelées communément « clients »), après que HSP70 en ait effectué les étapes précoces. HSP90 a pour fonction de maintenir l'équilibre du protéome au sein des cellules. Elle a pour action de contrôler le repliement des protéines, la liaison d'un ligand sur son récepteur, ou encore l'assemblage de complexes macromoléculaires.

2. La structure d'HSP90

HSP90 agit en homodimère et cette dimérisation est nécessaire à sa fonction.

Chaque monomère est composé de trois domaines conservés :

- un domaine N-Terminal (N ou NTD) impliqué dans la liaison de l'ATP
- un domaine central (M ou MD) important pour l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la liaison HSP90-clients (Prodromou et al. 1997)
- un domaine C-Terminal (C ou CTD) responsable de la dimérisation d'HSP90 (Harris et al., 2004)

Le NTD et le MD sont reliés par une séquence flexible « linker » (en rouge dans la Figure 1) qui dote HSP90 d'une souplesse et permet les changements de conformation nécessaires à sa fonction. Ainsi, le domaine NTD se comporte comme un couvercle et se retrouve éloigné du domaine MD dans la configuration « ouverte », puis en contact avec celui-ci dans la configuration « fermée ». La protéine HSP90 comporte un motif C-terminal MEEVD reconnu par les protéines

co-chaperonnes possédant des domaines Tetratricopeptid Repeat (TPR) particuliers (Brinker et al., 2002; Röhl et al., 2015).

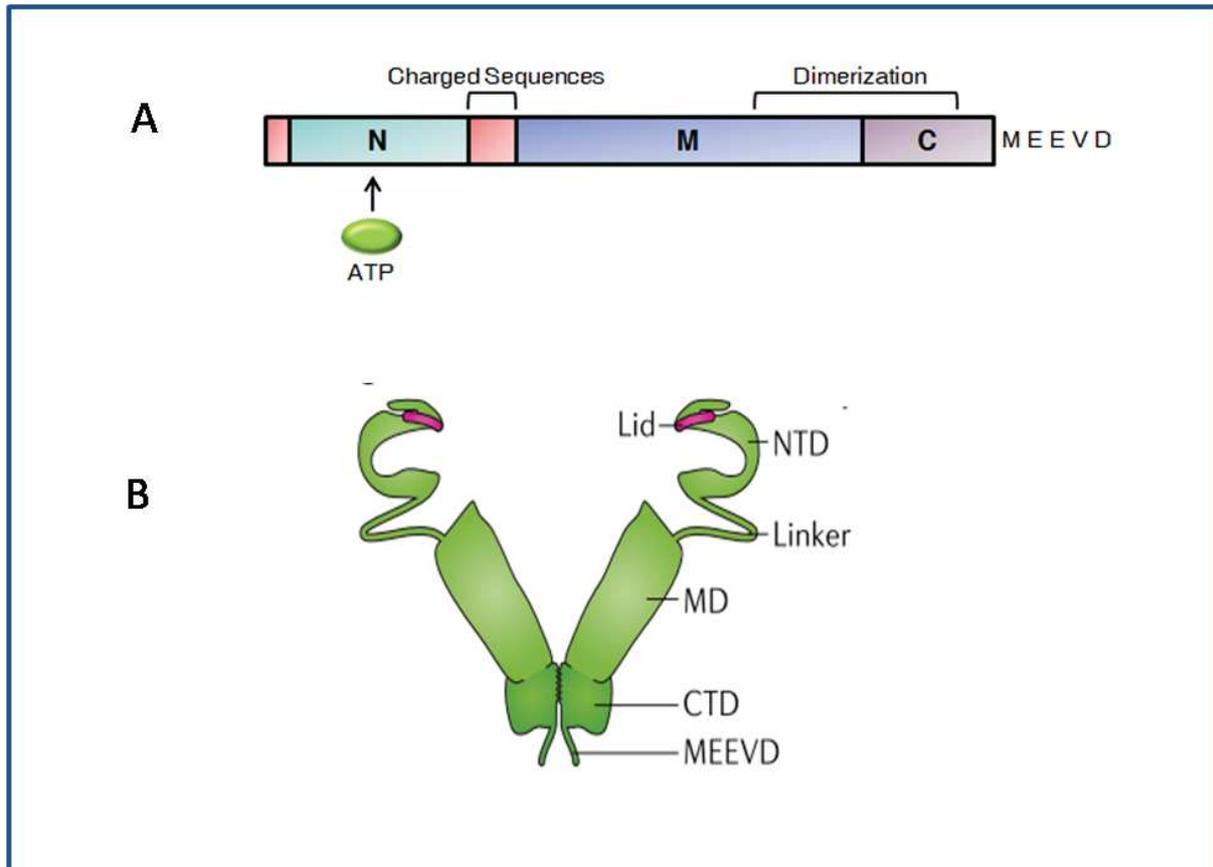


Figure 1 : Schéma de la structure d'HSP90.

A. Le domaine N-Terminal (N) en bleu/vert est impliqué dans la liaison à l'ATP, le domaine C-Terminal (C) est responsable de la dimérisation de HSP90. Le motif MEEVD en position C-terminale intervient dans la liaison aux co-chaperons contenant un motif TPR (par exemple RPAP3). La séquence indiquée en rouge intervient dans le changement de conformation du couvercle d'HSP90 lors de la liaison à l'ATP.

B. Représentation schématique de la structure d'un dimère d'HSP90. NTD : domaine N-terminal ; Linker : séquence mobile; Lid : couvercle ; MD : domaine central « middle » ; CTD : domaine C-terminal ; MEEVD : motif de liaison aux protéines à domaine TPR.

Adapté de (Wandinger et al., 2017)

3. Cycle de la protéine chaperonne HSP90

L'activité d'HSP90 est dépendante de l'ATP. Elle est soumise à un cycle de changements de conformation du dimère d'HSP90 (Figure 2 et 3). La protéine HOP (Hsp70-HSP90 Organizing Protein) est un co-chaperon d'HSP90, il l'accompagne dans l'initiation du cycle ATPasique. HOP fixe HSP90 dans sa forme « ouverte ». L'ATP est capté par chaque domaine NTD. Des changements de conformation s'opèrent, menant à la fermeture du couvercle sur la poche où se trouve l'ATP. Le dimère se trouve alors dans une forme « semi-fermée ». Les domaines NTD se lient entre eux pour donner lieu à la fermeture totale du dimère. Cette position est la conformation « fermée ». Cet état est nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP (Cunningham et al., 2008)(Figure 2). Le modèle représenté sur la Figure 3 est basé sur l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Figure 3), un client d'HSP90 très étudié. HSP90 est nécessaire à ce que le GR fixe son ligand et soit ainsi actif (Kirschke et al., 2014; Picard et al., 1990). Les protéines clientes néo-synthétisées sont d'abord prises en charge par le chaperon HSP40 pour éviter leur agrégation. HSP40 les transfère ensuite à HSP70 qui assure les étapes précoces du repliement. Un complexe se forme alors avec HOP (HSP70/HSP90 Organizing Protein), un co-chaperon précoce pour transférer le client à HSP90. La liaison à l'ATP se fait durant cette étape, et permet un changement de conformation du dimère d'HSP90 de la forme ouverte à la forme fermée. Ce changement est stimulé par le co-chaperon AHA1, que nous verrons plus loin. HSP70 et HOP se dissocient du complexe. L'étape suivante est l'hydrolyse de l'ATP. Elle est régulée par d'autres co-chaperons, p23 et PP5. A ce stade, la protéine client finit sa maturation, puis est libérée.

Si les sites de liaison des co-chaperons sur HSP90 sont pour la plupart connus (Figure 5), les sites de fixation des substrats semblent plus difficiles à trouver. Plusieurs équipes ont cherché en vain des motifs conservés qui seraient reconnus par HSP90 pour le remodelage du client. Ainsi, certaines kinases dépendent de HSP90 pour acquérir une conformation native, active, alors que d'autres ne dépendent pas de HSP90, malgré des séquences relativement proches (Taipale et al., 2010). Ceci a conduit à proposer qu'il y aurait une reconnaissance de la structure plutôt que de la séquence des clients.

L'étude de la protéine cliente TAU a permis de déterminer ses sites de liaison sur HSP90. TAU lie HSP90 en deux points : sur le MD et sur le NTD. Le site de fixation d'HSP90 sur la protéine TAU est composé d'acides aminés chargés négativement et hydrophobiques (Karagöz et al., 2014). D'autre part, la structure du complexe HSP90: CDC37: CDK4 a été résolue (Vaughan et al., 2006). Un chevauchement partiel apparaît entre le site de liaison du client TAU et celui de la kinase cliente CDK4. Un même site de HSP90 pourrait donc lier diverses protéines clientes :

kinases, récepteurs aux hormones, ou des protéines non repliées comme TAU. La liaison de l'ATP et son hydrolyse induisent un changement de conformation d'HSP90. Si un client se lie à la fois aux domaines NTD et MD, ce changement conformationnel d'HSP90 se transmet aux clients pour provoquer leur repliement.

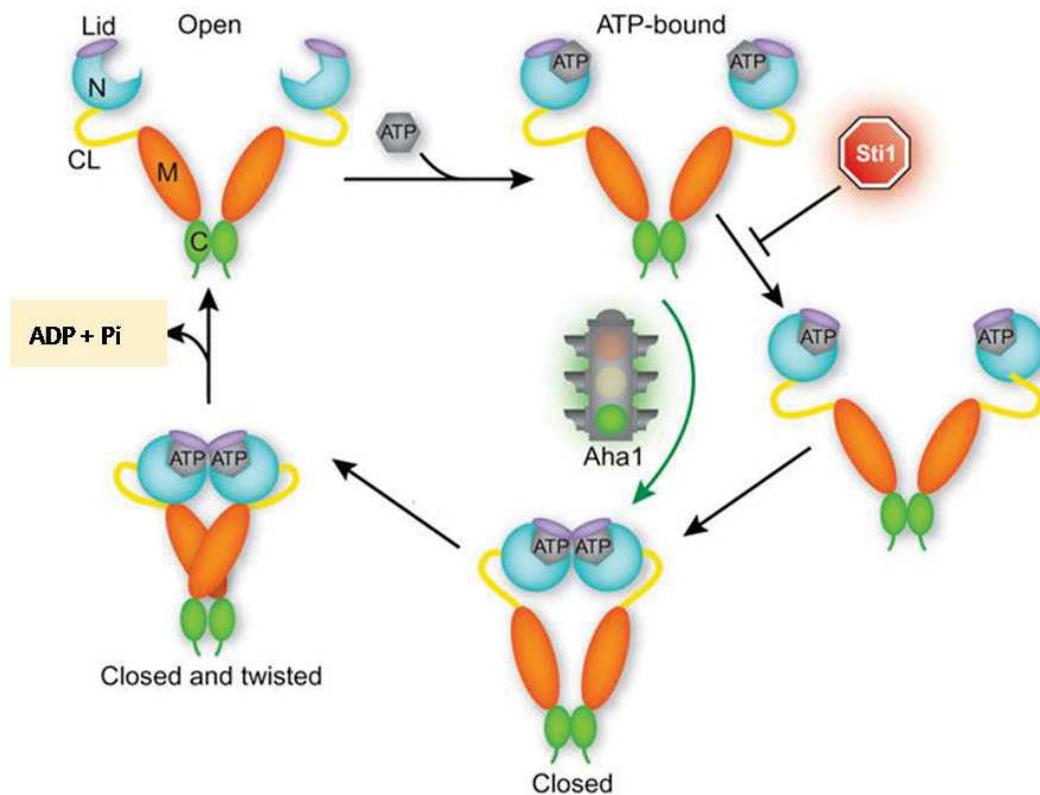


Figure 2: Représentation du cycle ATPasique responsable des changements de conformation du dimère HSP90.

1) Deux monomères de HSP90 forment un dimère par leur domaine C-Terminal (C). Le dimère est en position ouverte. 2) Les molécules d'ATP se fixent sur les domaines N-Terminaux (N). 3) La fermeture du couvercle (Lid) est stimulée par le co-chaperon Aha1. Cette position est la conformation fermée/closed ou fermée n°1. 4) Des changements de conformation des domaines aboutissent à la fermeture complète du dimère (closed and twisted) ainsi qu'à l'hydrolyse de l'ATP. Le largage de l'ADP et du phosphate permet à HSP90 de revenir en conformation ouverte, prête à entamer un nouveau cycle.

5) Le co-chaperon Sti/HOP peut inhiber l'avancée dans le cycle en restant fixé sur le domaine C-Terminal d'HSP90. Sti/Hop est un antagoniste du co-chaperon Aha1. C : domaine C-Terminal ; N : domaine N-Terminal ; M : domaine central « middle » ; CL : séquence chargée « charged linker »

Adapté de (Neckers et al., 2009)

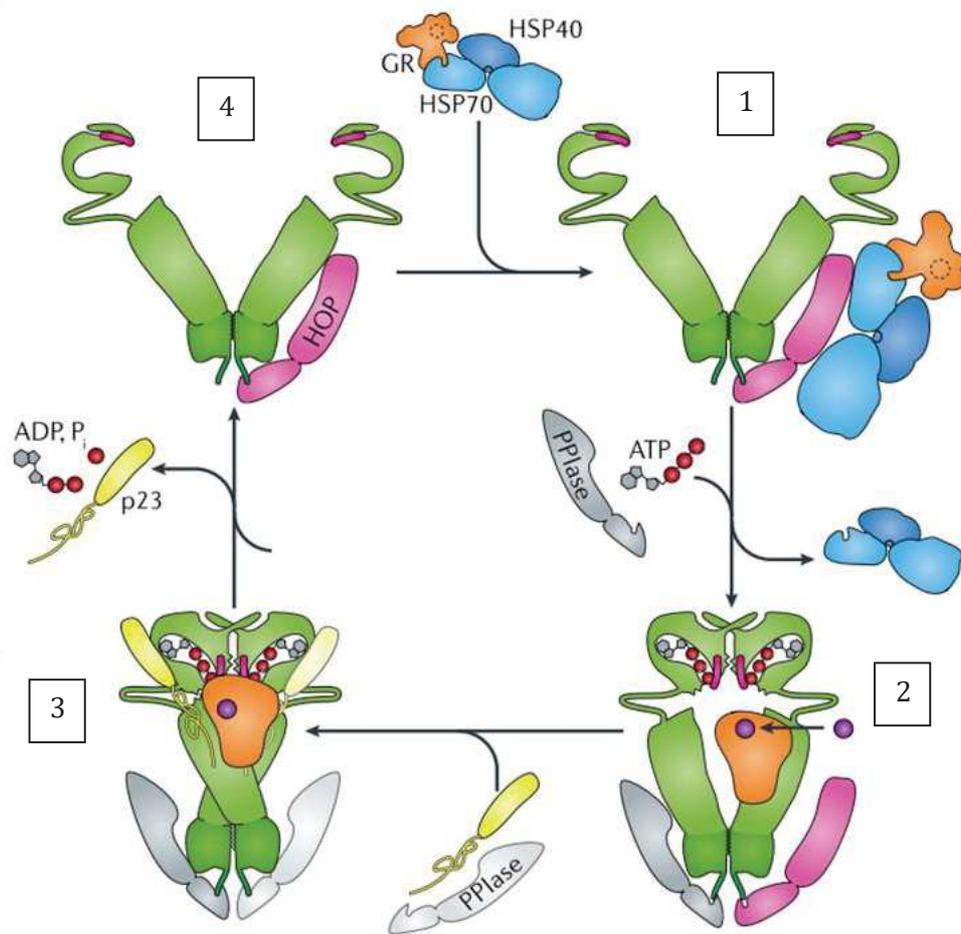


Figure 3 : Représentation de l'activation par HSP90 des récepteurs aux glucocorticoïdes avec l'intervention des co-chaperons.

1) Le récepteur aux glucocorticoïdes partiellement replié (GR) est amené par le complexe HSP70/HSP40 sur HSP90 via le co-chaperon HOP (dessiné en rose). 2) La liaison de l'ATP ainsi que du co-chaperon PPIase sur HSP90 entraîne la semi-fermeture du dimère HSP90 et la libération du complexe HSP70/40. PPIase permet la fixation du client grâce à leur activité « chaperonne like ». HSP90 fixe le récepteur aux hormones glucocorticoïdes, et le maintient dans une conformation qui permet la fixation des hormones glucocorticoïdes (en violet) sur leur récepteur. 3) HOP est libéré, le co-chaperon p23 (en vert pâle) permet la fermeture totale de la conformation d'HSP90. p23 est ensuite libéré à son tour avec l'ADP. 4) Le dimère de HSP90 est à nouveau en position ouverte lié à HOP, prêt à accueillir un nouveau client.

4. Régulation des fonctions d'HSP90 par ses co-chaperons

HSP90 a des milliers de clients qui interviennent dans des voies de signalisation ou divers processus, allant de la transcription à la réponse immunitaire, en passant par le développement (Figure 6). Elle est soumise à une régulation de ses fonctions à trois niveaux : par des modulations de son expression induite par des stress comme un changement de pH ou de température (Prodromou, 2016), par des modifications post-traductionnelles (PTM) et par des interactions avec des protéines co-chaperonnes. Ainsi une phosphorylation de HSP90 ou une acétylation peuvent moduler son interaction avec certains clients ou sa fonction ATPasique (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005; Mollapour et al., 2010).

Les co-chaperons sont des protéines qui interagissent physiquement avec une protéine chaperonne et l'aident dans l'exécution de ses fonctions (Figure 4 et 5). Ce ne sont pas des clients d'HSP90. Certains fixent le même site sur HSP90 et sont donc mutuellement exclusifs, tandis que d'autres se lient simultanément. On distingue deux catégories de co-chaperons : les régulateurs, qui régulent le cycle du chaperon HSP90 (cf. Figure 2, 3, et 4) et les adaptateurs, qui servent au recrutement des substrats (cf. 5. Les substrats). Certains peuvent avoir les deux fonctions. Typiquement, les co-chaperons possédant des domaines TPR caractéristiques appelés « carboxylate-clamp » (pince à carboxylate) peuvent lier le motif MEEVD du domaine C-Terminal d'HSP90. D'autres co-chaperons ne possèdent pas de TPR, et lient HSP90 *via* d'autres domaines.

Le co-chaperon le plus connu est HOP, que nous avons vu précédemment dans le cycle de changement de conformations d'HSP90. HOP est capable de lier HSP70 et HSP90. Il aurait pour fonction d'assurer le transfert des clients d'HSP70 sur HSP90. Il intervient dans la prise en charge des récepteurs aux glucocorticoïdes mais il agit aussi sur le cycle du chaperon en fixant HSP90 dans une conformation ouverte (Chen et Smith, 1998). Un autre co-chaperon à TPR est la protéine PP5 (Ser/Thr protein phosphatase) Elle lie le domaine N-ter d'HSP90 et empêche la formation de la conformation fermée. Elle déphosphoryle CDC37 qui favorise la poursuite du cycle. La déphosphorylation de CDC37 est nécessaire à la maturation des kinases et à leur libération (Oberoi et al., 2016). Le co-chaperon AHA1 stimule la fermeture du dimère d'HSP90 en se liant aux domaines NTD et MD, et il accélère ainsi le cycle ATPasique (Panaretou et al., 2002). La protéine p23 intervient dans les dernières étapes du cycle. Elle lie préférentiellement les domaines NTD et MD de la forme fermée d'HSP90, liée à l'ATP (Ali et al., 2006). Le co-chaperon p23 stabilise ainsi cet état, ce qui permet d'assurer la pleine maturation des clients en retardant l'hydrolyse de l'ATP (Johnson et Toft, 1994; Richter et al., 2004).

Le cycle ATPasique du changement de conformation d'HSP90 est régulé par plusieurs acteurs : HOP, CDC37 et p23 sont plutôt des ralentisseurs du cycle alors de AHA1 a tendance à l'accélérer (Forafonov et al., 2008; McLaughlin et al., 2006; Meyer, 2004; Panaretou et al., 2002; Roe et al., 2004; Zhang et al., 2010) (Figure 4).

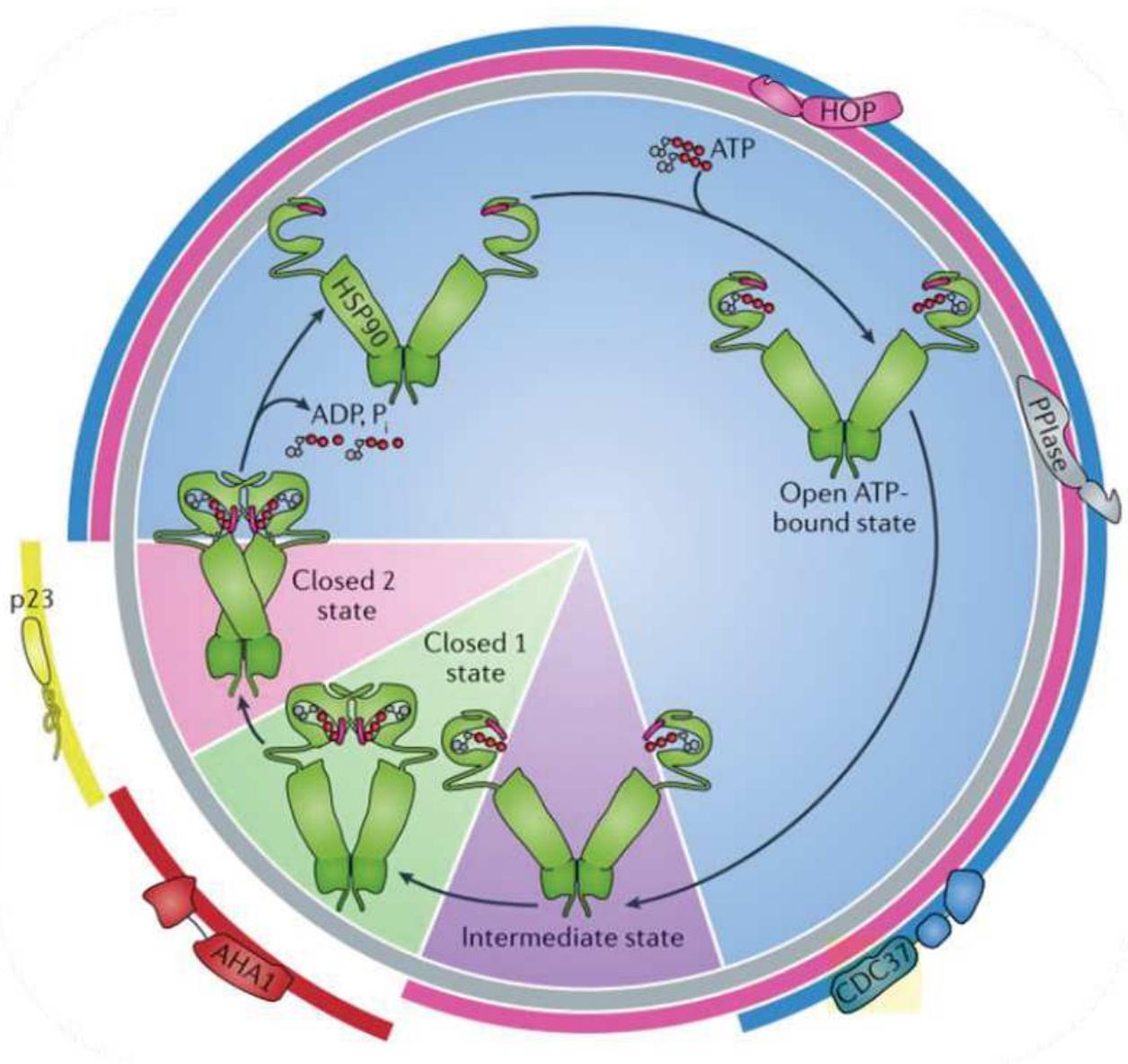


Figure 4 : Représentation des régulations du cycle d'HSP90 par ses co-chaperons.

Le co-chaperon HOP (cercle rose) se fixe par son domaine TPR au motif EEVD du motif C-Terminal d'HSP90. Il permet le maintien de la forme « ouverte » d'HSP90, favorable à la liaison des clients.

CDC37 lie le NTD et MD d'HSP90, participant au maintien de HSP90 dans sa forme ouverte. AHA1 (en rouge) stimule la fermeture du couvercle d'HSP90 (closed 1 state), favorisant ainsi l'hydrolyse de l'ATP. p23 intervient à la fin du cycle, il stabilise la forme fermée (closed 2 state) pour s'assurer de la maturation des clients, il est libéré en même temps que l'ADP et le phosphate inorganique. Les PPIase sont des protéines qui peuvent se fixer sur toutes les conformations d'HSP90. Leur fonction ne semble pas indispensable au déroulement du cycle. Elles interviennent dans le recrutement des clients en changeant leur conformation. (Wandinger et al., 2017)

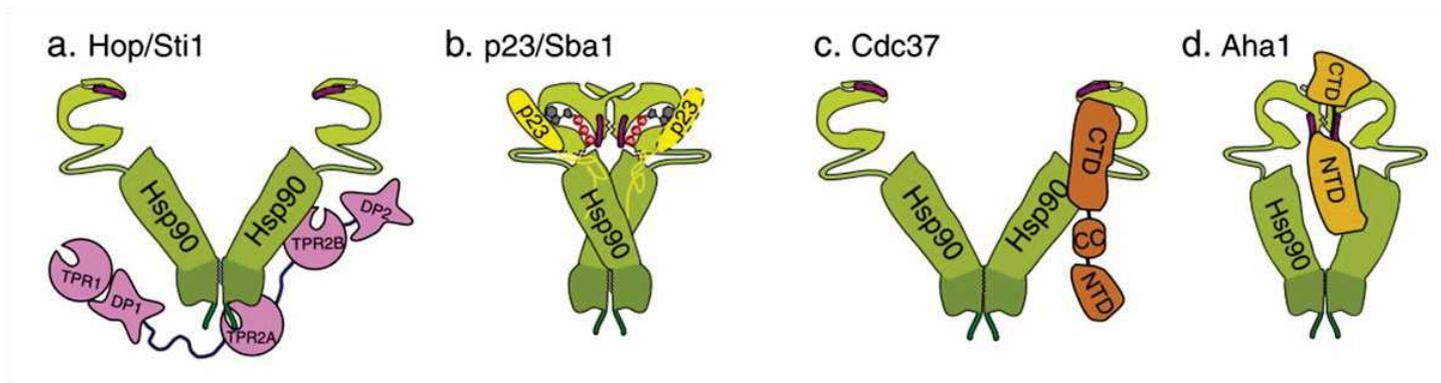


Figure 5 : Représentation des sites de liaison connus de quatre co-chaperons d'HSP90 chez S.cerevisiae

a. Hop/Sti1 se fixe sur le motif MEEVD du NTD d'HSP90 et sur le MD.

b. p23/Sba1 se fixe sur le NTD avec une légère fixation sur le MD aussi.

c. Cdc37, l'adaptateur des kinases, fixe le NTD et MD.

d. Aha1 se fixe au niveau du NTD pour fermer le couvercle du dimère d'HSP90

Adapté de (Li et al., 2012)

5. Les différents substrats et les co-chaperons « adaptateurs »

HSP90 a de nombreux substrats, et chaque co-chaperon adaptateur l'adresse à plusieurs clients. On peut distinguer au moins trois catégories de clients : (1) ceux dont HSP90 facilite le repliement en une forme active : c'est le cas des kinases (Boczek et al., 2015; Grammatikakis et al., 1999), (2) ceux dont HSP90 favorise l'assemblage en complexes macromoléculaires tels que les clients du R2TP (cf. section suivante), (3) et enfin une catégorie de clients dont HSP90 aide à la liaison avec leur récepteur, comme dans le cas des récepteurs aux hormones stéroïdes (Pratt et Toft, 1997)(Kirschke et al., 2014; Picard et al., 1990; Pratt et Dittmar, 1998). L'inhibition d'HSP90 peut avoir différentes conséquences sur ses substrats : certains sont redirigés vers le protéasome pour y être dégradés, certains s'agrègent en particules insolubles, d'autres s'accumulent sous forme inactive mais semblent solubles. Pour le moment, on ignore les déterminants moléculaires qui dictent quelle sera la conséquence de l'inhibition de HSP90 sur un substrat donné (Taipale et al., 2012).

Environ 10% des protéines de la cellule sont des clients d'HSP90, et environ 60% des kinases cellulaires sont dépendantes de CDC37 comme adaptateur. Cela fait de CDC37 un des co-chaperons adaptateurs les plus étudiés. De nombreuses équipes ont tenté, sans y parvenir, de trouver un motif qui serait reconnu par CDC37, et déterminerait quelle kinase serait ou non prise en charge par CDC37 pour l'adresser à HSP90 (Taipale et al., 2012).

Les PPIases ont une activité similaire aux protéines chaperonnes. Elles sont capables de replier les protéines, ici les substrats clients d'HSP90 pour favoriser leur recrutement (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996; Ou et al., 2001).

D'autres clients de HSP90 sont la TERT (TElomerase Reverse Transcriptase)(Holt et al., 1999), eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) (Sessa et al., 1998), des facteurs de transcription (Sepelhorn et al., 1996) ou des protéines associées à la chromatine comme Trithorax (Tariq et al., 2009) (Figure 6).

Un nouveau co-chaperon de HSP90 a été identifié par W.Houry en 2005 chez *S.cerevisiae* : le complexe R2TP. Ce complexe présente la particularité d'être composé de 4 protéines : RUVBL1, RUVBL2, PIH1D1 et RPAP3. Il interagit avec HSP90 via le domaine TPR de la protéine RPAP3. Ensemble, HSP90 et le complexe R2TP permettent l'assemblage de machineries cellulaires. R2TP définit une nouvelle fonction de la protéine chaperonne HSP90 dans le repliement quaternaire des protéines (voir ci-dessous partie sur le R2TP). La découverte de nouveaux co-chaperons comme le complexe R2TP a permis d'identifier des substrats d'HSP90 et ainsi, de mieux comprendre les effets de l'inhibition de HSP90.

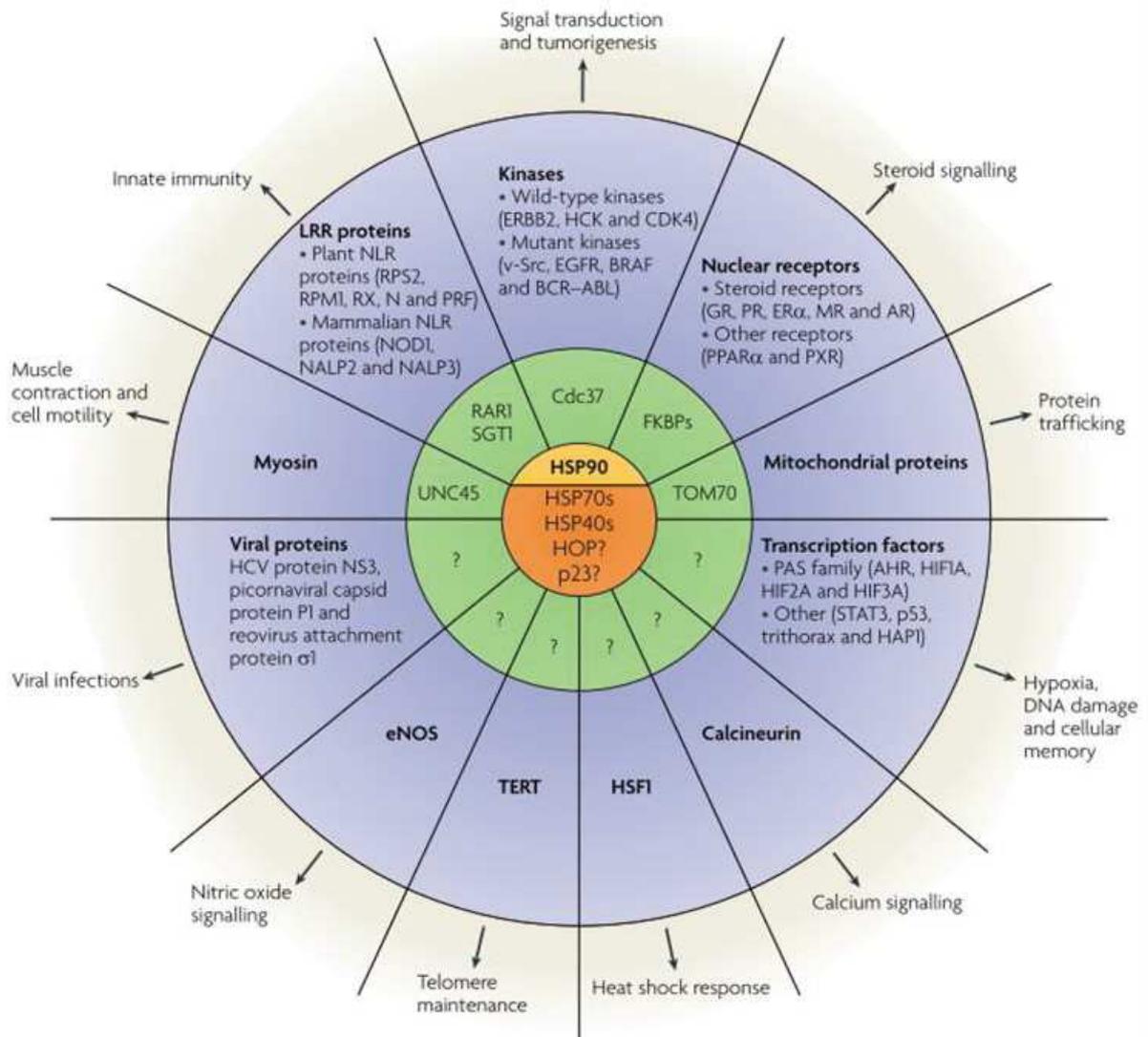


Figure 6 : Représentation de la liste non exhaustive des clients d'HSP90

Issue de (Taipale et al., 2010). Les cercles concentriques représentent les différents niveaux d'interactants. Au milieu, en orange se situe la chaperonne HP90, ainsi que les deux autres chaperonnes du complexe précoce HSP70/HSP40. Le rôle des co-chaperons HOP et p23 n'a pas été mis en évidence pour tous les clients, cela reste à démontrer. Le cercle vert indique les différents adaptateurs connus, notamment CDC37 pour les kinases. Le cercle violet liste les diverses catégories de clients d'HSP90, dont les adaptateurs sont parfois encore inconnus. Enfin le dernier cercle nous informe sur les différentes fonctions des clients dans lesquelles HSP90 se retrouve impliquée. Cette liste des co-chaperons est loin d'être exhaustive et l'équipe du Dr. D. Picard s'occupe de la mettre à jour (<https://www.picard.ch/download>).

6. Rôles dans l'organisme

Du fait de la multitude de ses clients, de son implication dans diverses machineries et voies signalisations, HSP90 est impliquée dans de nombreuses maladies. C'est notamment le cas des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer *via* la protéine TAU (Karagöz et al., 2014), certaines infections virales, ou la fibrose kystique, due à une mauvaise conformation du récepteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Wang et al., 2006). Les études portant sur les fonctions de HSP90 ou de ses co-chaperons dans des organismes sont encore très limitées. Elles abordent essentiellement deux aspects : le rôle de HSP90 dans l'évolution et dans la tumorigénèse.

a) HSP90 et la « canalisation » des mutations.

A partir d'études chez la drosophile, l'équipe de S. Lindquist élabore l'hypothèse que HSP90 serait un « capaciteur évolutif » en « tamponnant les mutations ». Il serait donc un moteur de l'évolution. Ce concept découle de l'observation que l'inhibition ou des mutations hypomorphes de HSP90 chez la drosophile font apparaître des phénotypes absents de la population contrôle et des parents. S. Rutherford et S. Lindquist ont émis l'hypothèse de la « canalisation » : certaines mutations ne s'exprimeraient pas dans un organisme où HSP90 serait actif car elle tamponnerait ces mutations. Son activité chaperonne permettrait d'atténuer, voire de masquer l'effet de ces mutations, et ainsi de permettre leur transmission. Ceci aboutirait à une plus grande variété génétique. (Rutherford et Lindquist, 1998). Ces mutations pourraient procurer un avantage sélectif lors d'un changement environnemental, et être ainsi sélectionnées. Cette fonction semble conservée dans les différents organismes testés mais le mécanisme reste encore débattu (Jarosz et Lindquist, 2010; Queitsch et al., 2002; Rohner et al., 2013; Rutherford et Lindquist, 1998).

De récentes études ont remis en cause cette hypothèse de la canalisation par HSP90. En effet, HSP90 contrôle la biogenèse des machineries qui permettent de réprimer la transposition d'éléments génomiques mobiles dans les lignées germinales (Gangaraju et al., 2011; Karam et al., 2017; Specchia et al., 2010) : ainsi l'inhibition de HSP90 provoque des mutations transmissibles à la descendance. Ces résultats remettent en question le rôle de HSP90 dans la tolérance phénotypique à des mutations. Quoiqu'il en soit, un rôle de canalisateur évolutif reste associé à HSP90. Ainsi les kinases clientes de HSP90 évoluent plus rapidement que les kinases qui ne sont pas substrats d'HSP90 (Lachowiec et al., 2015).

b) Lien entre HSP90 et les cancers

HSP90 s'avère essentielle pour les cellules normales mais encore plus pour les cellules tumorales, ce qui ouvre une potentielle fenêtre thérapeutique. De plus, l'inhibition de HSP90 par certains de ses inhibiteurs entraîne la dégradation de ses clients. Les kinases et les récepteurs impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance constituent une classe importante de clients d'HSP90. Ces voies sont presque systématiquement suractivées dans les cancers (Moser, Lang, et Stoeltzing, 2009a) (Figure 8). HSP90 a ainsi été proposée comme cible thérapeutique.

Dans le cancer du sein, HSP90 est très fortement exprimée dans les cellules cancéreuses en comparaison avec les cellules normales, et ceci est associé à une diminution de la survie des individus (Pick et al., 2007). Les délétions de HSP90 α ou de TRAP1 (l'isoforme mitochondrial de HSP90) n'ont pas le même effet dans un modèle murin de cancer du sein, mais aucune n'est nécessaire pour l'initiation du processus de tumorigénèse. Elles joueraient un rôle plutôt dans la progression tumorale (Vartholomaiou et al., 2017). Ces chaperons auraient donc un rôle direct sur le cancer.

L'instabilité génétique des cellules tumorales favorise l'apparition de résistance aux traitements. L'inhibition de HSP90, en limitant la tolérance des cellules tumorales aux mutations, pourrait contrecarrer l'apparition de ces résistances. Ainsi, l'inhibition à faible dose de HSP90 potentialise les traitements hormonaux de tumeurs du sein (Whitesell et al., 2014).

Une cinquantaine d'essais cliniques ciblant HSP90 sont en cours, mais les effets secondaires peuvent s'avérer nombreux. Une nouvelle stratégie serait de cibler les co-chaperons de HSP90 pour restreindre les clients ciblés. Il est donc nécessaire d'élucider leurs mécanismes d'action au sein d'un organisme pour pouvoir savoir s'il est possible ou non de les proposer comme cibles thérapeutiques anticancéreuses.

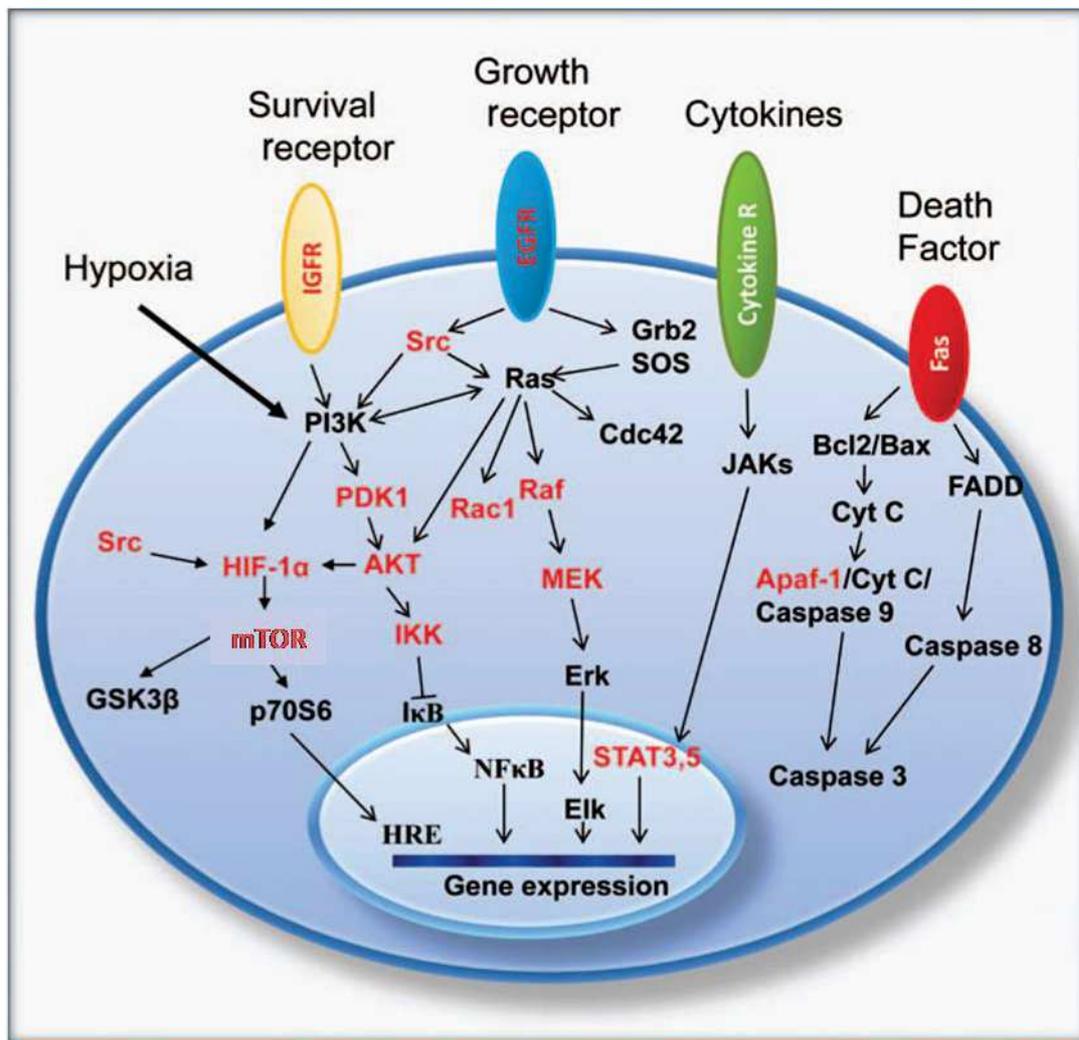


Figure 7 : Schéma des voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale

Sont représentées ici les principales voies de transduction des signaux impliquées dans la carcinogénèse digestive. En rouge sont annotés les clients d'HSP90 (Moser et al., 2009b). HSP90 apparaît donc comme un bon candidat pour inhiber la progression tumorale. Si HSP90 est inhibée, cela aura des répercussions sur toutes les molécules en rouge, et permettrait de réprimer plusieurs voies simultanément.

c) Quelques modèles murins d'étude de chaperons ou de co-chaperons

Le knockout de HOP chez la souris entraîne une létalité embryonnaire au 10^{ème} jour du développement. Un des phénotypes est la baisse des niveaux des clients d'HSP90 (Beraldo et al., 2013).

Chez la souris, la méthode de « gene trapping » a permis d'isoler une modification du gène p23 induisant une létalité périnatale. Cette létalité est causée par des défauts de la peau et des poumons malformés (Grad et al., 2006; Lovgren et al., 2007).

Les souris TRAP1^{-/-} sont viables, fertiles et présentent moins de maladies relatives à l'âge. De plus, ces souris ne présentent pas de dysplasie ou de tumeur. (Lisanti et al., 2014)

Les modèles murins d'HSP90 d'inactivation de α et β présentent, contre toute attente, des phénotypes très différents :

- la forme constitutive HSP90 β : son knockout n'est pas viable, les embryons meurent au cours du développement embryonnaire aux alentours du 9^{ème} jour, suite, entre autres, à un défaut de formation du placenta (Voss et al., 2000).
- la forme inductible HSP90 α : la délétion de ce gène n'est pas létale, et le premier phénotype observé est un défaut de spermatogénèse (Grad et al., 2010). Par la suite, d'autres phénotypes y ont été associés comme des défauts dans la présentation des antigènes par les cellules dendritiques (Imai et al., 2011).

Ces analyses montrent surtout que la perte de HSP90 β ne peut pas être compensée par HSP90 α , elles ont donc des rôles bien distincts.

Les modèles murins de co-chaperons d'HSP90 proposés sont des inactivations dans l'organisme en entier, en général non viables. En l'absence d'inactivation tissu-spécifique, il est difficile de déterminer la cause à l'origine du phénotype observé. En restreignant l'étude à une catégorie de clients, l'analyse de l'inactivation d'un co-chaperon permettrait de mieux comprendre la fonction de HSP90 dans l'organisme.

B. Le complexe R2TP, co-chaperon d'HSP90

1. Découverte du R2TP

Le complexe R2TP a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'équipe de Walid Houry en 2005 comme un nouveau co-chaperon de la protéine HSP90 (Zhao et al., 2005). Grâce à l'association de différentes méthodes (cribles de double-hybride chez la levure, tests de létalité synthétique, expériences de protéomique et co-immuno-précipitations), ils ont pu mettre en évidence deux nouveaux interactants d'HSP90 : Tah1 et Pih1 pour « TPR-containing protein Associated with Hsp90 » et « Protein Interacting with Hsp90 ». Pih1/Nop17 avait été identifiée comme un facteur de la biogenèse des snoRNP (small nucleolar RiboNucleoParticles – cf. B.3.a) (Gonzales et al., 2005). Tah1 n'avait jamais été décrit auparavant. Le complexe Tah1-Pih1 lie les protéines Rvb1 et Rvb2 (RuvB-like protein) pour former le complexe R2TP, capable de lier HSP90 (voir plus bas). Les protéines Rvb1 et Rvb2 sont très similaires entre elles et font partie de la famille des ATPases AAA+. Elles forment des hétéro-hexamères et des hétéro-dodécamères (Gribun et al., 2008). R2TP est le premier co-chaperon multimérique décrit pour HSP90.

Des expériences de protéomique ont montré que le R2TP est conservé chez l'homme et la drosophile (Benbahouche et al., 2014; Boulon et al., 2008). Chez l'homme, les protéines homologues sont PIH1D1 (pour Pih1), RPAP3 (pour Tah1), et RUVBL1/RUVBL2 pour Rvb1/Rvb2). Comme chez la levure *S. cerevisiae*, les protéines humaines PIH1D1/RPAP3 (homologue de Pih1/Tah1) forment un hétérodimère stable, qui s'associe aux hétéro-hexamères de RUVBL1/2 (Figure 4; (Boulon et al., 2008; Zhao et al., 2008). Enfin, le R2TP humain se lie à 7 autres protéines, dont la plupart sont de la famille des préfoldines, pour former le complexe R2TP/Prefoldin-like. La fonction de ces préfoldines est mal connue (Boulon et al., 2010) (Figure 9).

Chez la levure et l'homme, RUVBL1 et RUVBL2 font également partie de complexes macromoléculaires intervenant dans le remodelage de la chromatine, comme INO80 ou SRCAP. Dans l'étude initiale de 2005, il avait été suggéré que HSP90 aurait une nouvelle fonction, via le complexe R2TP, sur la chromatine et donc sur l'expression des gènes. Cependant, la première fonction décrite du R2TP – et à ce jour la mieux documentée – porte sur l'assemblage d'une famille de petites particules ribonucléiques non-codantes: les snoRNP.

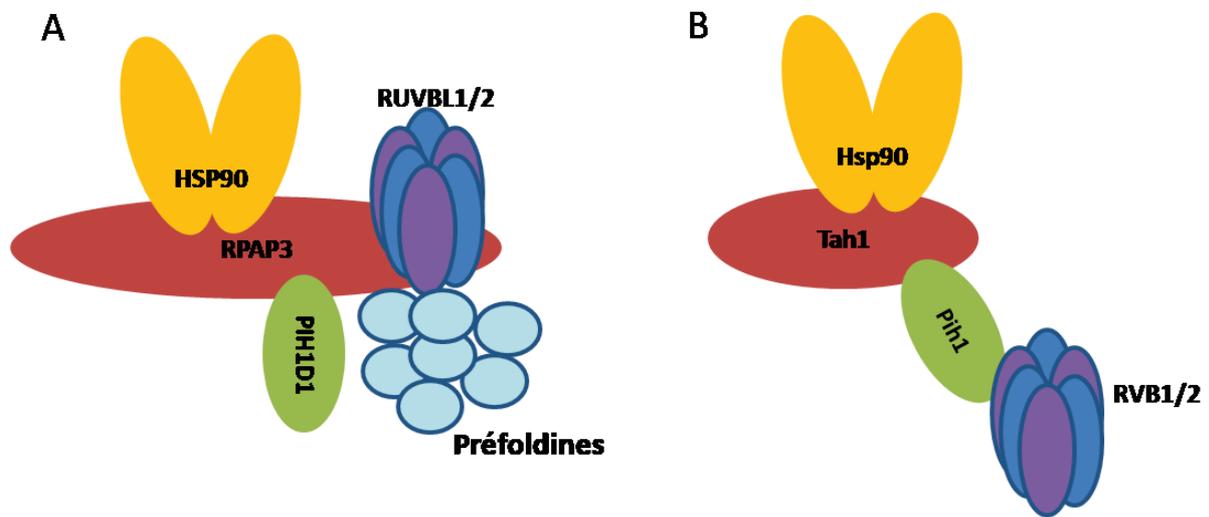


Figure 8 : Représentation schématique du complexe R2TP chez l'homme et *Saccharomyces cerevisiae*

A) Le complexe R2TP humain : dimère d'HSP90 en jaune, lié par RPAP3. En bleu clair, le complexe de préfoldines qui est absent chez *S. cerevisiae*. RPAP3 permet la liaison à PIH1D1 ainsi que RUVBL1, RUVBL2. B) Le complexe R2TP chez *S. cerevisiae* : RVB1/2 sont recrutés par Pih1 ; Tah1, est plus petit que chez l'homme et lie HSP90 et Pih1.

2. Structure et mode de fonctionnement du R2TP

Le complexe R2TP est globalement conservé de *S.cerevisiae* à l'homme, en passant par la drosophile. Il est composé de deux modules: un hétérodimère RPAP3-PIH1D1 (Tah1-Pih1 chez l'homme), et un multimère des ATPases RUVBL1/RUVBL2 (Rvb1/Rvb2 chez la levure). Les ATPases portent l'activité catalytique du complexe, et l'hétérodimère RPAP3-PIH1D1 aurait plusieurs fonctions : recrutement de HSP90, adaptateur des substrats, voire régulateur de l'activité des ATPases RUVBL1/2 (Angel Rivera-Calzada et al., 2017a; Tian et al., 2017) . La fonction du R2TP dans l'assemblage des snoRNP C/D est conservée de *S.cerevisiae* à l'homme. Cependant, le rôle du R2TP dans l'assemblage des ARN polymérase, des snRNP et des PIKK n'est pas encore démontré chez *S.cerevisiae*. La structure en 3 dimensions à haute résolution du R2TP est difficile à obtenir de façon complète du fait de la grande difficulté à manipuler les ATPases RUVBL1/RUVBL2.

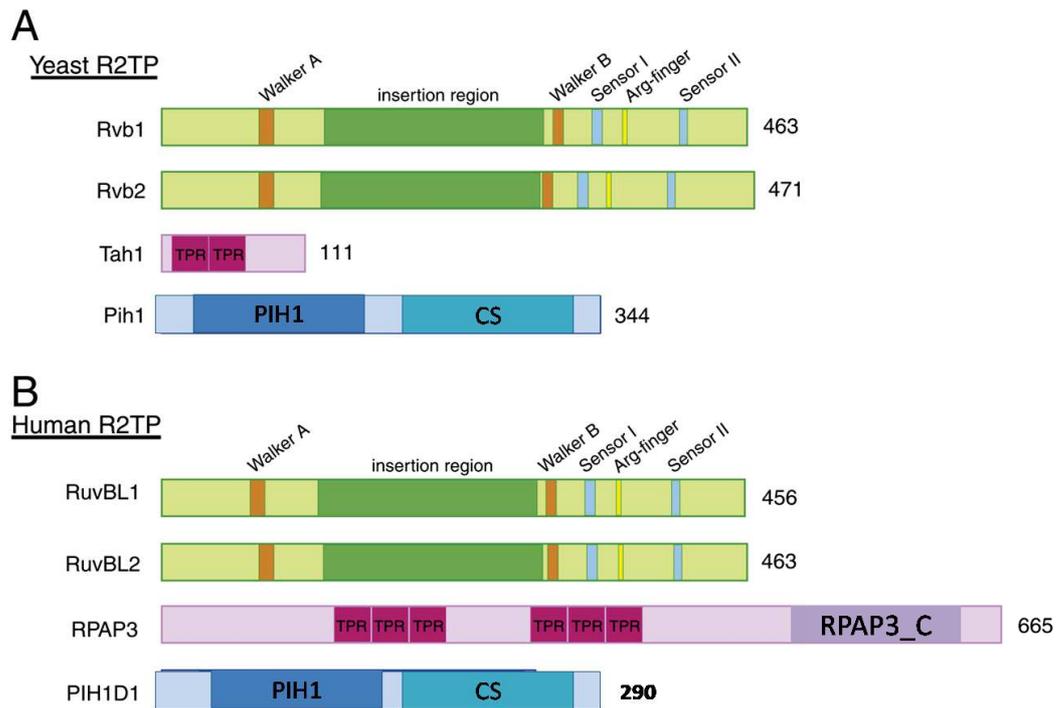


Figure 9 : représentation schématique des protéines composant le R2TP chez l'homme et chez *S.cerevisiae*

adapté de (Kakihara et Houry, 2012).

Chez l'homme comme chez *S. cerevisiae*, le R2TP est composé de quatre protéines.

Les AAA+ ATPases, *Rvb1/Rvb2* (*S.c*) et *RUVBL1 /RUVBL2* (humain) ont des structures très conservées.

Tah1 est 6 fois plus petit que son homologue *RPAP3*. Ils comportent tous les deux des TPR qui leur permettent de lier *HSP90*. Le domaine C-ter de *RPAP3* est absent de *Tah1*.

Pih1 est plus grand que *PIH1D1* mais comporte les mêmes domaines : *PIH1* et le domaine *CS*.

a) Tah1 /RPAP3

Tah1 est une protéine de 111 acides aminés, pour l'essentiel composée de motifs « Tetra-trico-peptide repeat » appelés TPR. Ces motifs TPR sont formés de 34 aa structurés en hélice-coude-hélice. Ils ont été découverts initialement dans des protéines régulatrices du cycle cellulaire, CDC23 et NUC (Sikorski et al., 1990). Ces motifs sont souvent regroupés en domaines de 3 à 16 répétitions de TPR se terminant par une hélice qui vient fermer la structure. Des résidus conservés dans certains domaines TPR leur confèrent la propriété de lier le motif C-terminal EEVD des protéines chaperons HSP90 et HSP70 : on parle de « carboxylate clamp » (Russell et al., 1999). Tah1 ne contient que 3 domaines de TPR (le dernier domaine étant incomplet), mais ils sont suffisants pour lier le motif C-terminal -MEEVD de la protéine HSP82 (l'homologue de HSP90 chez *S.cerevisiae*) (Back et al., 2013; Jiménez et al., 2012; Morgan et al., 2015). Le mutant de Tah1 est viable mais montre un défaut de survie en condition de pousse saturante des levures, interprété comme un stress nutritif (Zhao et al., 2008).

RPAP3 est l'homologue de Tah1 chez les mammifères. C'est la protéine la plus dissemblable entre le R2TP de levure et de l'homme : elle est 6 fois plus longue que Tah1. Sa structure comprend :

- (i) un domaine N-terminal dont la fonction reste, aujourd'hui encore, inconnue,
- (ii) deux domaines TPR permettant de lier la protéine HSP90 (Pal et al., 2014; Quinternet et al., 2015)
- (iii) un domaine C-terminal conservé, appelé le domaine « RPAP3-Cter », et que j'ai longuement étudié au cours de ma thèse (voir plus loin la partie Résultats 2) pour en élucider le rôle.

Il existe 2 isoformes de RPAP3 générés par épissage alternatif de l'exon 12, en aval du deuxième domaine TPR (Yoshida et al., 2013b). L'isoforme 1 est le plus grand (665 aa), tandis que l'isoforme 2 est composé de seulement 631 aa. Seul l'isoforme 1 lie PIH1D1, ce qui suggère que la région après les TPR est importante pour lier PIH1D1, de manière analogue à ce qui a été décrit chez *S.cerevisiae* (Yoshida et al., 2013a).

Spaghetti est l'homologue de RPAP3 chez *D. melanogaster*. *Spaghetti* est essentiel, contrairement à *Tah1* dans la levure : la délétion de *Spaghetti* est létale au stade larvaire. Cependant, une déplétion à l'âge adulte n'entraîne pas de phénotype visible dans les tissus (Benbahouche et al., 2014). Cela suggère que *Spaghetti*, comme *Tah1*, ne joue pas un rôle crucial pour la croissance cellulaire en absence de stress.

b) Pih1 / PIH1D1

Pih1 est le partenaire de Tah1 dans la levure. Il contient 344 aa et est composé d'un domaine PIH N-terminal et d'un domaine C-terminal « CS » (pour « CHORD et SGT », deux co-chaperons de HSP90 chez lesquels ce domaine a été caractérisé). Le domaine PIH est similaire à celui de son homologue humain, et on suppose qu'il assure le même rôle dans la liaison des adaptateurs et des substrats du R2TP (Hořejší et al., 2014; Pal et al., 2014). Le domaine désorganisé compris entre les domaines N-ter et C-ter de Pih1 est nécessaire au recrutement des Rvb1/Rvb2 (Angel Rivera-Calzada et al., 2017b; Paci et al., 2012). Un tel domaine semble absent de l'homologue humain. Enfin, le domaine CS est formé par un sandwich de feuillettes β antiparallèle de 7 brins. Ce domaine lie l'extrémité C-terminale de Tah1 (Pal et al., 2014).

PIH1D1, l'homologue humain de Pih1, est légèrement plus court que son homologue Pih de *S. cerevisiae* (290 aa au lieu de 344). Il présente une organisation similaire avec un domaine PIH N-terminal et un domaine CS C-terminal. La partie N-terminale (N-ter) de PIH1D1 comporte le domaine PIH, nécessaire à la liaison à TELO2, un adaptateur spécifique d'une classe de clients du R2TP, les PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases). La résolution de la structure en cristallographie de cette partie avec le phosphopeptide de TELO2, connu pour interagir avec PIH1D1 (Hořejší et al., 2010a), a permis d'identifier deux résidus de PIH1D1 (les lysines 57 et 64), présent dans une poche du domaine et impliqués dans la liaison aux sérines phosphorylées de TELO2 (Hořejší et al., 2014; Pal et al., 2014). Plus généralement, ces deux résidus sont impliqués dans la reconnaissance d'un motif conservé : DpSDD/E (pS signifie que la sérine est phosphorylée). Ce motif est suffisant pour lier le domaine PIH (Hořejší et al., 2010a, 2014). Ce motif est présent dans TELO2 mais également dans d'autres protéines, dont certaines se sont avérées être des substrats du R2TP (von Morgen et al., 2017). La mutation du résidu K64 du domaine PIH en alanine abolit l'interaction avec TELO2 et, par la même occasion, avec les PIKK, mais également avec plusieurs substrats du R2TP (Hořejší et al., 2014). Cette étude, ainsi que les données de protéomiques du domaine PIH faites dans notre équipe (Malinová et al., 2017) a montré que le domaine PIH de PIH1D1 jouait un rôle crucial dans la reconnaissance d'une série de substrats du R2TP. Il est cependant probable que l'interaction des substrats avec PIH1D1 ne fasse pas toujours intervenir un motif DpSDD/E.

Le domaine CS en Cter est nécessaire pour la liaison avec le reste du R2TP : RPAP3/RUVBL1/2 (Hořejší et al., 2014). Les modalités pourraient ressembler au modèle décrit chez *S. cerevisiae* (Pal et al., 2014). Lorsque j'ai débuté ma thèse, le mode d'association de RPAP3 et des RUVBL1/2 à PIH1D1 était inconnu (cf. Résultats -2).

c) Les protéines AAA+ ATPases : RUVBL1 /2

RUVBL1 et RUVBL2 (respectivement Rvb1 et Rvb2 chez la levure) sont des protéines d'environ 50kDa. Elles sont connues sous divers noms (Pontin/Reptin; Tip48/Tip49; p50/p55), et elles ont été trouvées dans un grand nombre de complexes protéiques. Elles font partie de la superfamille des ATPases AAA+ (Adenosine triphosphatase Associated with diverse cellular Activities), une famille de protéines oligomériques possédant une structure en forme d'anneau souvent hexamérique, et un site de liaison à l'ATP partagé entre sous-unités adjacentes (Gribun et al., 2008). RUVBL1 et RUVBL2 ont des structures très similaires entre elles, et elles ont tous les motifs canoniques des ATPases AAA+, y compris les domaines Walker A et B connus pour fixer les nucléotides et hydrolyser l'ATP, respectivement (Jha et Dutta, 2009) (Figure 9). Cependant, une caractéristique unique de ces protéines, par rapport aux autres enzymes de cette famille, est la présence d'une insertion appelée domaine II, qui semble jouer un rôle essentiel dans leur activité (Figure 10 et voir plus bas) (Jha et Dutta, 2009). De nombreuses équipes ont tenté de résoudre la structure des RUVBL, seules ou ensemble, mais du fait de la difficulté à les manipuler, ces études ont longtemps donné des résultats contradictoires. Les deux difficultés pour l'étude structurale des RUVBL, sont que d'une part, la présence de tags altère l'état multimérique de ces protéines (Cheung et al., 2010), d'un hexamère vers un dodécamère, et que d'autre part le domaine II est très flexible (Matias et al., 2006). Ceci a empêché la cristallisation des protéines entières jusqu'à présent.

Une première controverse a porté sur l'éventuelle activité hélicase de ces enzymes (Ikura et al., 2000; Matias et al., 2006; Qiu et al., 1998). RUVBL1/2 sont en effet proches des protéines RUVB/RUVB bactériennes dont elles tirent leur nom. RuvA et RuvB sont des hélicases d'ADN impliquées dans la résolution de structures particulières de l'ADN ("holliday junction") créées lors des processus de réparation de l'ADN (Iwasa et al., 2016). Du fait de leur présence dans des complexes associés à la chromatine, plusieurs études ont cherché à montrer une activité hélicase de RUVBL1/RUVBL2 sur des acides nucléiques (Huen et al., 2010; Ikura et al., 2000). Même s'il est accepté que les RUVBL se lient aux acides nucléiques *via* leur domaine II, il est maintenant admis que leur activité hélicase est minime – voire inexistante. De plus, des analyses phylogénétiques plus récentes montrent qu'elles ne sont pas les homologues de RuvA/RuvB.

Une deuxième controverse a porté sur la stœchiométrie des complexes, hexamériques ou dodécamériques. Il est maintenant établi que les formes hexamériques et dodécamériques existent toutes deux et sont probablement toutes deux importantes biologiquement. L'hexamère est un anneau composé de trois sous-unités de RUVBL1 intercalées par trois sous-unités de RUVBL2, et le domaine II de ces enzymes est situé au dessous de l'anneau. Le dodécamère est un dimère d'hexamères, et la dimérisation se fait *via* les domaines II (Zhou et al., 2017). Enfin, une

étude récente suggère que la présence d'un substrat entraîne à la fois une augmentation de l'activité ATPasique des RUVBLs et le passage d'une forme hexamérique à une forme dodécamérique (Zhou et al., 2017). Dans le dodécamère, le substrat est lié au domaine II, près de la surface de dimérisation. Les formes dodécamériques se résolvent en hexamère après hydrolyse de l'ATP, ce qui suggère un cycle dans lequel la liaison du substrat entraîne la dimérisation de l'hexamère, vers une forme activée des RUVBL. Cette forme activée serait compétente pour lier d'autres protéines additionnelles du complexe, ce qui stimulerait alors l'hydrolyse de l'ATP et le relâchement de deux sous-unités assemblées (Zhou et al., 2017). Dans l'ensemble du processus, la flexibilité du domaine II est essentielle. Bien que spéculatif, ce modèle est le plus abouti et permet d'expliquer comment l'activité ATPase confère une activité chaperonne aux RUVBL, laquelle serait spécifiquement impliquée dans le folding quaternaire des protéines.

Il existe un certain nombre d'études structurales sur les RUVBL (Angel Rivera-Calzada et al., 2017b; Puri et al., 2007; Snider et al., 2006; Torreira et al., 2008). Les structures cristallines à haute résolution ont d'abord été obtenues en tronquant le domaine II, et des structures à plus basse résolution ont été obtenues par cryoEM sur les protéines entières. Plus récemment, l'utilisation du champignon thermophile *Chaetomium thermophilum* a permis l'obtention de structures à haute résolution avec les protéines entières. Celles-ci ont confirmé les modèles hexamériques et dodécamériques proposés, dans lesquels les RUVBL1 et RUVBL2 alternent pour former des anneaux simples ou doubles, avec un domaine II flexible, qui sort de l'anneau et permet la dimérisation des hexamères (Lakomek et al., 2015)(Figure 10). Des études de modélisation ont également bien montré la flexibilité du domaine II et le couplage entre sa position et l'état de liaison au nucléotide au sein de l'anneau, ce qui pourrait expliquer comment l'ATP peut réguler l'échange hexamère-dodécamère (Afanasyeva et al., 2014).

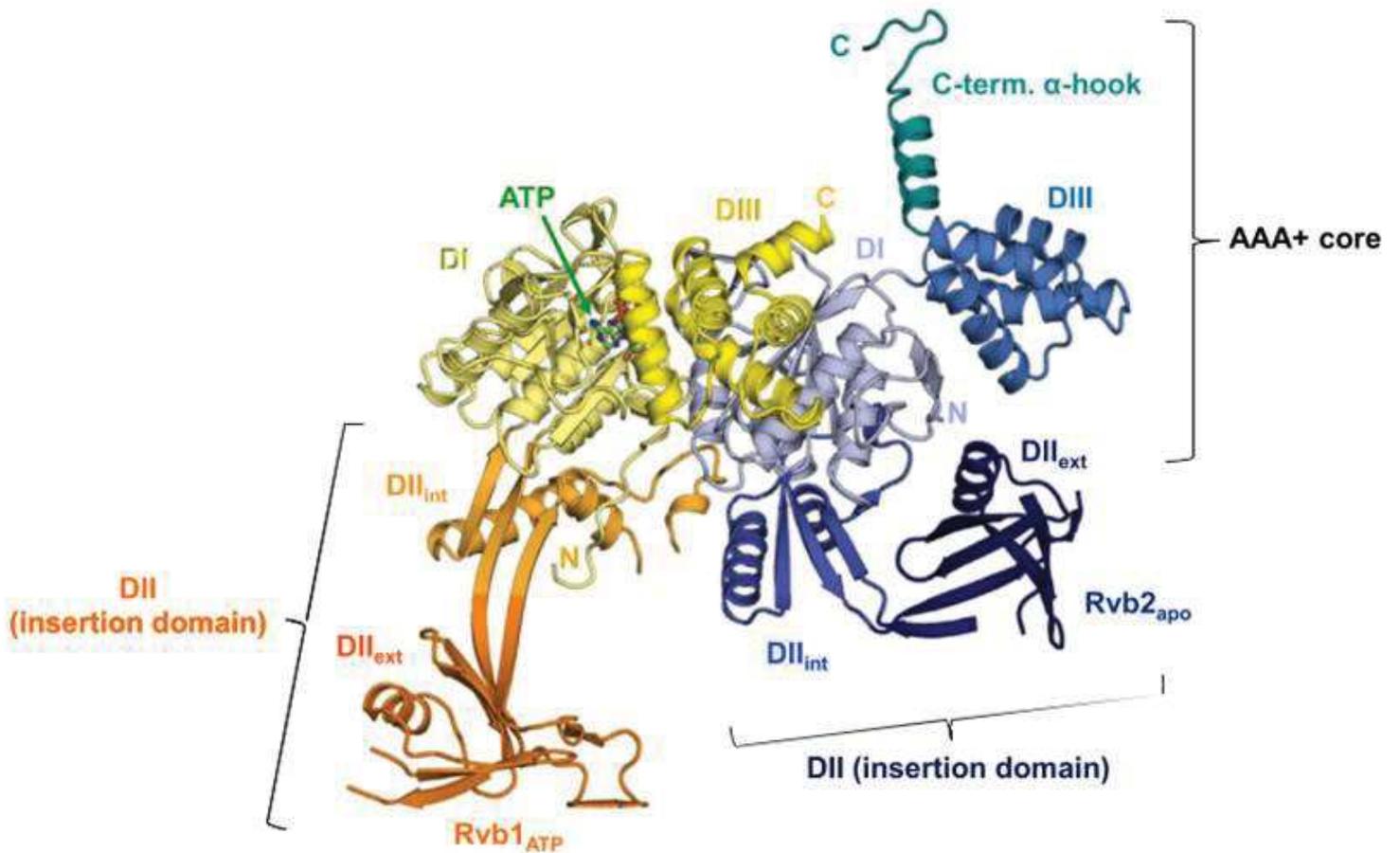


Figure 10: Représentation de la structure d'un dimère de Rvb1: Rvb2 chez *Chaetomium thermophilus*.

Le monomère de Rvb1 est dans sa forme lié à l'ATP alors que le monomère de Rvb2 est dans sa forme apo. Les différentes couleurs représentent les domaines de Rvb1 (jaune, orange, rouge) et ceux de Rvb2 (bleu et vert).

Extrait de (Lakomek et al., 2015)

Les RUVBL sont des sous-unités constitutives de plusieurs complexes de remodelage de la chromatine, comme INO80, SWR-C et TIP60. Il est possible que leurs rôles dans ces complexes soient similaires à celui qu'elles jouent au sein du R2TP. Des données suggèrent même que le R2TP soit impliqué en amont dans l'assemblage de INO80 et TIP60 (Jha et al., 2013; Jónsson et al., 2004). Dans le cas du complexe INO80 de *S. cerevisiae*, des études montrent que Rvb1/Rvb2 sont nécessaires au recrutement de la sous-unité Arp5, peut-être par un mécanisme d'assemblage similaire à celui décrit ci-dessus (Jónsson et al., 2004). Deux études plus récentes décrivent les structures à basse résolution des complexes Ino80 et SCR1, obtenues par cryoEM (Nguyen et al., 2013; Tosi et al., 2013). INO80 est composé d'une tête qui loge Rvb1/Rvb2, d'un corps et d'un pied. Dans ce modèle structural, l'hétéro hexamère Rvb1/Rvb2 est situé loin du nucléosome, le substrat de INO80. Les données suggèrent un changement de conformation des Rvbs, qui leur permettrait de moduler l'activité de SNF2, le composant catalytique du remodelage des nucléosome (Jónsson et al., 2004; Tosi et al., 2013). Ce changement de conformation permet le basculement du module "pied" (qui contient Arp8), et ainsi de modifier la position du nucléosome qui doit être modifié. Par la suite, les protéines enzymatiques effectuent les modifications (Figure 11). Les Rvbs, dans ce contexte, permettraient de moduler l'activité du complexe INO80 (Tosi et al., 2013)(Figure 12).

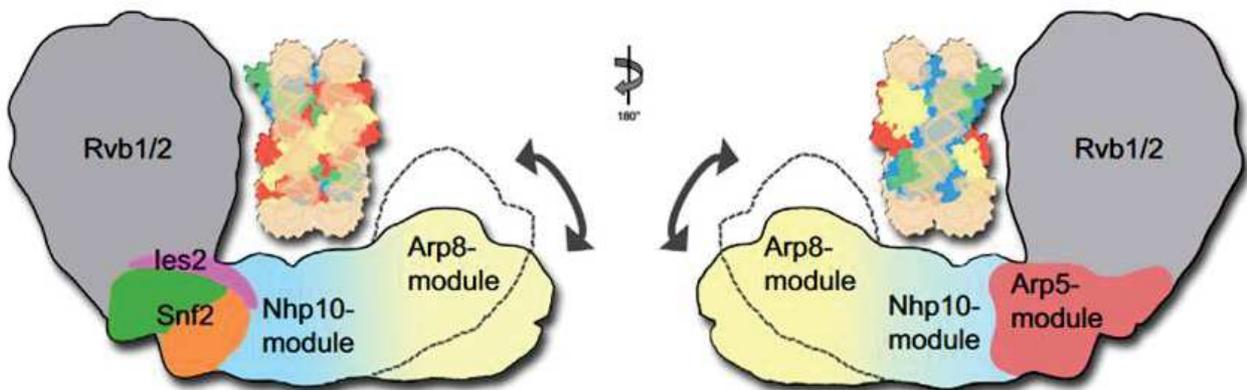


Figure 11 : Schéma de la structure du complexe Ino80 chez *S.cerevisiae*

Adapté de(Tosi et al., 2013)

INO80 est composé de 3 parties : La tête comprenant les Rvb1 / 2 , le corps avec l'activité catalytique « Arp5 module », les2 et Snf2, et enfin les pieds « Arp8 module ».

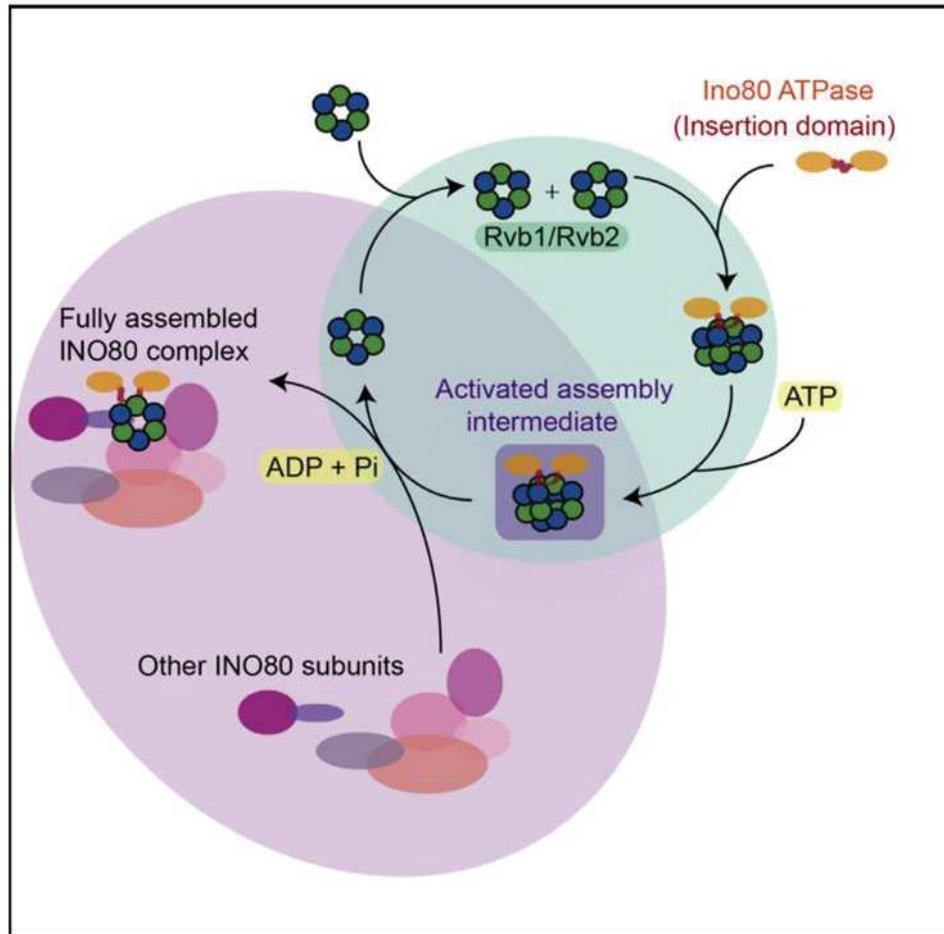


Figure 12 : représentation schématique du rôle de Rvb1 et Rvb2 dans l'assemblage du complexe INO80

Deux hétéro-hexamères de Rvb1/ Rvb2 viennent former un dodécamère. Ce complexe recrute la sous unité catalytique d'INO80. L'hydrolyse de l'ATP permet le changement de conformation de Rvb1/2 en un état actif. Un hexamère de Rvb1/2 associé à la sous-unité catalytique est assemblé au reste des sous unités du complexe INO80 pour former le complexe mature.

Extrait de (Zhou et al., 2017)

d) La structure du R2TP entier

Tout récemment, la structure tri-dimensionnelle du R2TP de *S.cerevisiae* a été résolue à basse résolution par l'équipe de Llorca, en utilisant la cryoEM (Angel Rivera-Calzada et al., 2017b). Pih1p en est le composant central. Il recrute Tah1 *via* son domaine CS, et Rvb1/2 *via* son motif central, absent de PIH1D1. Rvb1/2 sont sous une forme hexamérique et lient Pih1 *via* leurs domaines II. Dans le complexe, l'hétérodimère Pih1-Tah1 se situe donc au-dessus de l'anneau, et apparaît comme étant dans une position idéale pour réguler la dimérisation de l'hexamère de Rvb.

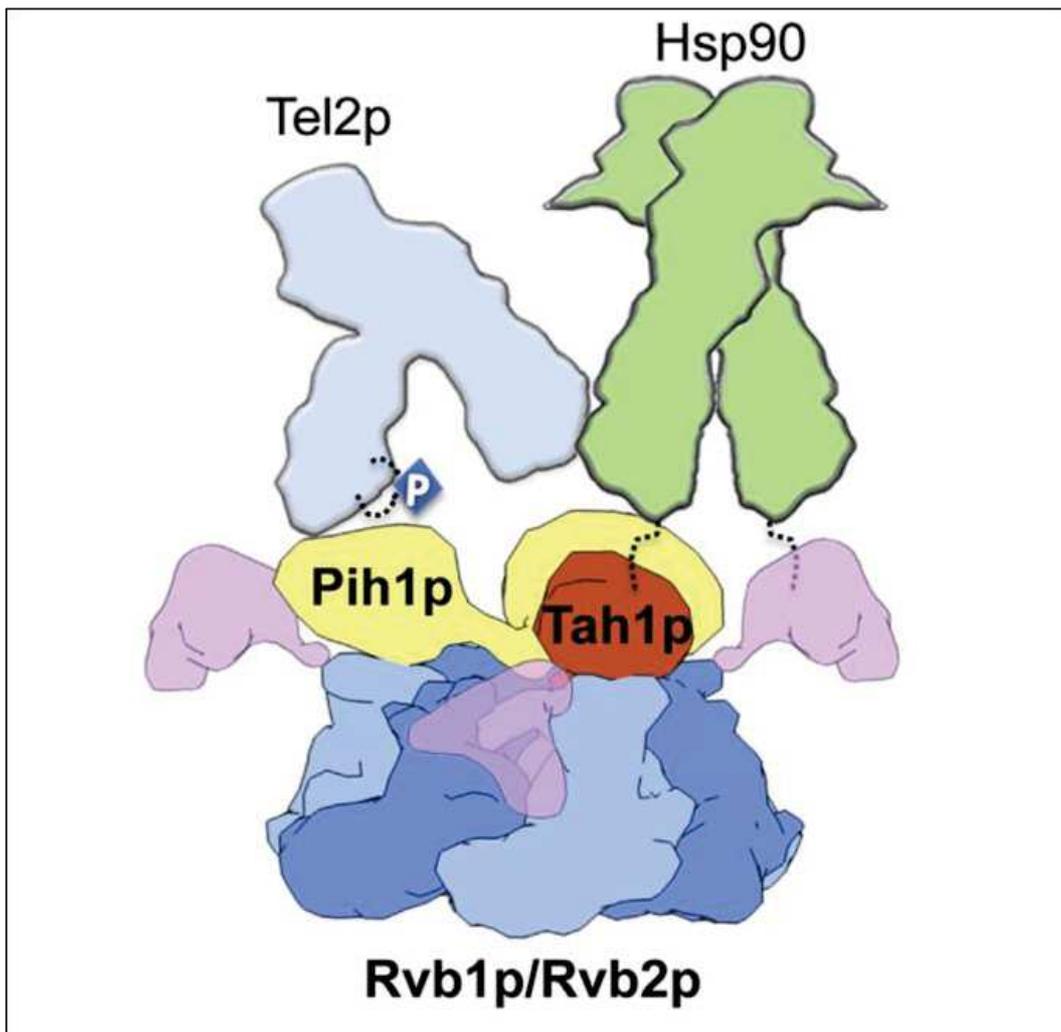


Figure 13 : Représentation de la structure à basse résolution du complexe R2TP chez *S. cerevisiae*.

adapté de (Angel Rivera-Calzada, et al., 2017)

Si la structure 3D du R2TP de *S.cerevisiae* commence à être élucidée, il reste néanmoins de nombreuses zones d'ombre sur le R2TP des mammifères, du fait que les protéines qui le composent diffèrent sensiblement de leurs homologues, et en particulier RPAP3. Notamment, nous ne savons toujours pas comment les protéines RUVBL1 et RUVBL2 sont assemblées dans ce complexe. Est-ce qu'il y a un domaine d'interaction sur PIH1D1 similaire à celui de levure ? Il semble que non, au vu des données de (Hořejší et al., 2014), qui montrent que l'interaction de PIH1D1 avec les RUVBL se ferait *via* le domaine CS, donc peut-être *via* la protéine RPAP3. Il faut ici souligner que, lorsque j'ai commencé ma thèse, deux domaines de RPAP3 restaient inconnus d'un point de vue structural et fonctionnel: les domaines N-terminal et C-terminal.

L'analyse du rôle joué par le domaine C-terminal de RPAP3 a fait l'objet d'une partie de ma thèse, en collaboration avec l'équipe de Xavier Manival et Bruno Charpentier à Nancy et de Pedro Matias à Lisbonne (cf. Résultats - article n°2).

3. Les substrats du complexe R2TP

a) Les snoRNP (Small nucleolar Ribo-Nucleo-Protein particles)

Ces particules comportent chacune un petit ARN nucléolaire non-codant associé à 4 protéines conservées. Il existe plusieurs centaines de ces ARN chez l'homme, qui se répartissent en deux grands groupes: les snoRNP à boîtes C/D et ceux à boîtes H/ACA. Ils se différencient par la présence de motifs conservés sur les ARNs ("boîtes C/D" ou "boîtes H/ACA" ; figure 14), qui dictent le recrutement d'un jeu de 4 protéines conservées. Les snoRNP à boîte C/D comprennent les protéines SNU13, NOP56/NOP58 (deux protéines très similaires entre elles), et la fibrillarine (FBL), qui porte une activité méthyltransférase. Les snoRNP H/ACA sont composés des protéines NHP2, NOP10, GAR1 et de la dyskérine (DKC1), qui a une activité pseudo-uridine-synthase. Les snoARNs des deux classes possèdent une séquence d'appariement qui guide la particule vers un ARN cible spécifique (majoritairement des ARN ribosomiques) pour définir le nucléotide qui sera modifié par l'enzyme associée à la particule – on parle d'ARN guide. Les snoRNP C/D entraînent une 2'-O-méthylation de ce nucléotide, et les H/ACA une pseudo-uridylation.

Malgré l'apparente simplicité des snoRNP, l'assemblage de ces particules se fait en plusieurs étapes et passe par des complexes transitoires avant de former la particule mature. L'importance de ces cofacteurs est soulignée par le fait que, jusqu'à ce jour, aucune équipe n'a réussi à reconstituer une particule de snoRNP fonctionnelle chez les Eucaryotes, à partir de constituants synthétisés *in vitro* (et ce, malgré la petite taille des composants). Des études détaillées ont en revanche été menées en utilisant le système des Archaeobactéries, où des particules "snoRNP-like", appelées sARN, s'assemblent en complexes fonctionnels *in vitro*, en absence de tout facteur d'assemblage (Charpentier, Muller, & Branlant, 2005; Omer, Ziesche, Ebhardt, & Dennis, 2002). Une protéine clé dans la structure est la protéine NOP5, qui est l'homologue à la fois de NOP56 et NOP58. Les protéines NOP5, NOP56 et NOP58 comportent trois domaines: un domaine N-terminal, un domaine coiled-coil et un domaine NOP. Des études structurales ont montré que les C/D d'Archae ont une structure pseudo-dimérique qui comporte deux modules. Le premier module est organisé autour de deux motifs C/D présents sur les sARN. Les motifs C/D sont longs d'une dizaine de nucléotides et se replient en un "K-turn". Ces motifs C/D permettent la formation d'un complexe ternaire avec L7Ae (l'homologue de SNU13) et NOP5, dans lequel d'une part L7Ae contacte NOP5, et d'autre part L7Ae et NOP5 ont tous deux des contacts base-spécifiques avec l'ARN. Le domaine NOP de NOP5 est suffisant pour assembler ce complexe ternaire. Le deuxième module est composé de la fibrillarine associée au domaine N-terminal de NOP5. Ce module est flexible par rapport au premier comprenant l'ARN, et cette

mobilité est essentielle pour l'activité catalytique du complexe. Finalement, les deux motifs C/D présents sur l'ARN permettent la formation d'un pseudo-dimère, grâce à une interaction entre les protéines NOP5 placées sur chacun des motifs C/D. Cette dimérisation de NOP5 se fait par son domaine coiled-coil, et elle est essentielle pour déterminer quelle base de l'ARN cible va être modifiée. Dans le système Eucaryote, les données disponibles suggèrent que la structure du complexe est similaire, et que NOP58 se lie au motif C/D qui clôt l'ARN, tandis que NOP56 se lie du côté apical (Figure 15).

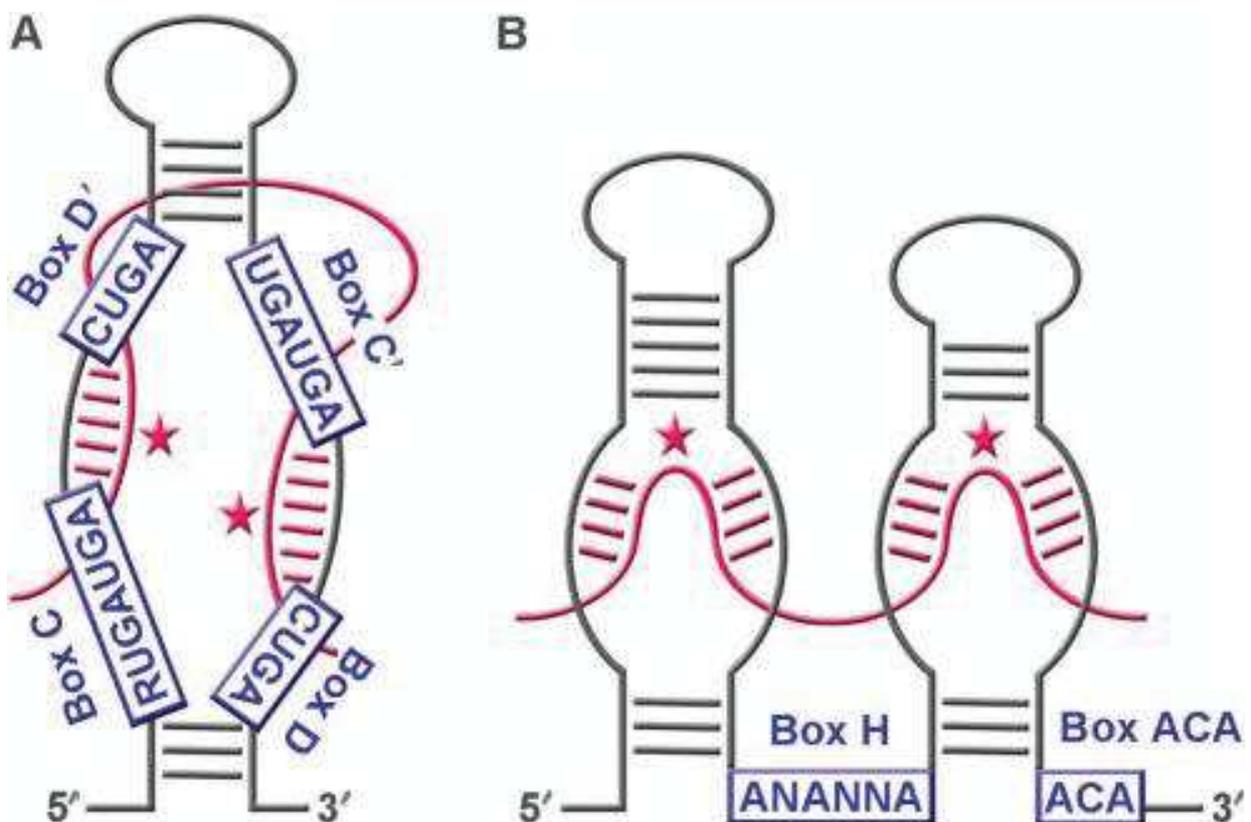


Figure 14 : Représentation des ARNs à boîtes C/D (A) et à boîtes H/ACA (B)

Extrait de (Reichow et al., 2007)

En bleus sont représentés les motifs conservés appelés « boîtes », il y a d'un côté le snoARN à boîtes C/D et de l'autre le snoARN à boîtes H/ACA. En rouge, l'ARN substrat modifié par la particule.

b) R2TP et assemblage des snoRNP à boîtes C/D

Historiquement, l'équipe travaillait sur l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D. Cet assemblage comporte plusieurs étapes qui se déroulent dans différents territoires du noyau (Celine Verheggen et Bertrand, 2012). Du fait de l'impossibilité de reconstituer une particule *in vitro*, la stratégie pour analyser les étapes d'assemblage des snoRNP C/D a principalement reposé sur l'analyse en protéomique des complexes intermédiaires, en les purifiant *via* un facteur d'assemblage (NUFIP1, C12ORF45...) ou de sous-unités surexprimées (NOP58, NOP56). Ces analyses sont complémentées par des cribles en double-hybride chez la levure pour affiner les interactions, des reconstitutions de complexes *in vitro*, ainsi que du fractionnement cellulaire et des expériences d'immunofluorescence. Les tentatives de reconstitution de snoRNP C/D Eucaryotes *in vitro*, en utilisant uniquement les protéines cœur, ont permis de dégager des informations importantes (Omer, et al., 2002). Tout d'abord, comme chez les Archées, le snoARN à boîtes C/D se replie selon un « K-turn », qui est lié *in vitro* par la protéine SNU13. Ce complexe peut ensuite se lier aux protéines à domaines NOP, et le modèle proposé était donc que SNU13 se lie d'abord au snoARN, ce qui permettrait ensuite l'arrimage des 3 autres protéines : Nop56, Nop58 et fibrillarine. Les études *in vivo* ont cependant montré que ce modèle était sans doute erroné (Bizarro et al., 2014; Boulon et al., 2008). L'hypothèse d'un assemblage grâce au système R2TP/HSP90 est supportée par de nombreuses données: (i) des études de protéomique qui montrent un lien entre les snoRNP C/D et les deux ATPases RUVBL1 et 2 (Newman et al., 2000), qui semblent concerner plus particulièrement NOP58; (ii) des études d'interactions qui montrent d'une part des liens entre les protéines cœur des snoRNP et le R2TP (e.g. Pih1 avec Nop58 (Gonzales et al., 2005), et d'autre part des liens entre des facteurs d'assemblage des snoRNP et le R2TP (e.g. NUFIP1 avec PIH1D1 (Bizarro et al., 2014; Boulon et al., 2008; Quinternet et al., 2015); ZNHIT6 avec RUVBL1/2 (K. S. McKeegan, et al. 2009; R. Zhao et al., 2008), et enfin des liens entre les différentes protéines du R2TP et les snoARN eux-mêmes (Boulon et al., 2008; Kenneth Scott McKeegan, et al., 2007); (iii) des expériences de létalité synthétique entre des protéines du R2TP et des facteurs d'assemblage des C/D (Rothé et al., 2014a); (iv) des expériences fonctionnelles qui montrent des défauts de formation des particules C/D dans des mutants du R2TP de *S. cerevisiae* (pour Rvb1/2, voir (King et al., 2001); pour Pih1 et Tah1 voir (Boulon et al., 2008; Zhao et al., 2008), et dans des knock-down chez l'homme (Kenneth Scott McKeegan et al., 2007; Watkins, et al., 2002).

L'assemblage des snoRNP se fait par l'intermédiaire de complexes transitoires, et donc nécessite plusieurs étapes faisant intervenir différents cofacteurs. Dans l'assemblage des snoRNP C/D, au moins 4 facteurs ont été identifiés. Ces facteurs pourraient être des adaptateurs

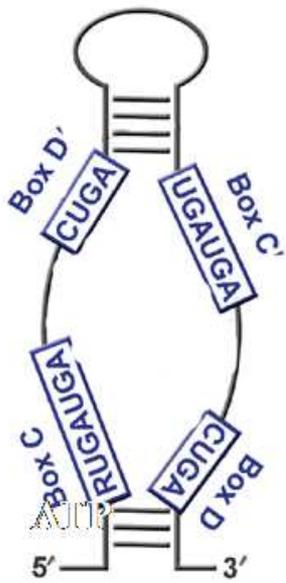
entre le R2TP et les protéines à assembler, et ils pourraient également réguler l'activité des ATPases RUVBL1/2.

Bcd1 est essentiel chez la levure pour l'accumulation des snoRNP C/D (Peng et al., 2003), mais sa fonction est mal caractérisée bien qu'il interagisse avec les ATPases Rvb1/2 et probablement régule leur activité (Verheggen, Pradet-Balade, & Bertrand, 2015). Ce facteur est conservé chez l'homme et s'appelle ZNHIT6.

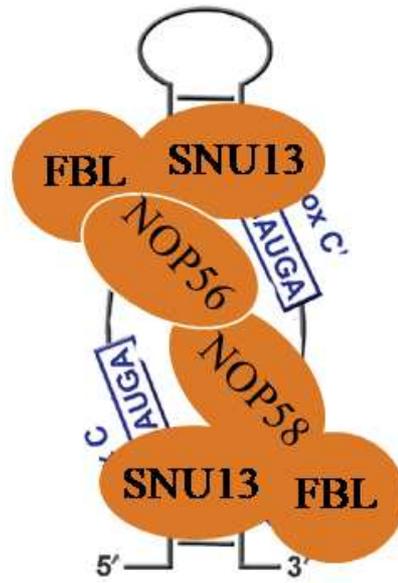
NUFIP1 est un facteur trouvé chez l'homme lors d'un crible double hybride avec SNU13 (Boulon et al. 2008). Ce facteur interagit aussi avec ZNHIT3 pour former un complexe trimérique *in vitro* (Rothé et al., 2014b). Ces protéines sont conservées chez la levure *S. cerevisiae* (Rsa1 et ZNHIT3). NUFIP1 interagit avec PIH1D1 et cette interaction est également conservée chez la levure.

C12ORF45 est une protéine trouvée chez l'homme lors d'un crible de protéomique avec NOP58. Cette protéine interagit avec les ATPases RUVBL1/RUVBL2 mais n'est pas conservée dans la levure.

Des expériences de protéomiques ont permis de définir une voie d'assemblage dans le système C/D humain (Bizarro et al., 2014). Le processus débute par la formation d'un complexe uniquement protéique, et composé des 7 protéines suivantes: SNU13, NOP58, NUFIP, ZNHIT3, ZNHIT6 et les ATPases RUVBL1/RUVBL2 (Figure 16). L'idée est que ce complexe se forme à partir de trois modules ((Bizarro et al., 2014) et des données de l'équipe non publiées): (i) le complexe ternaire entre SNU13/ZNHIT3/NUFIP1; (ii) NOP58 néo-synthétisé et associé avec le chaperon HSP90; (iii) le R2TP. Le R2TP aiderait la formation du complexe à 7 protéines, d'une part en interagissant avec les deux autres modules, et d'autre part en venant charger les ATPase RUVBL1/RUVBL2 sur les protéines SNU13 et NOP58 (Figure 16). Dans les étapes suivantes d'assemblage, le complexe à 7 protéines s'associerait au snoARN, et le facteur ZNHIT3 serait remplacé par la fibrillarine et NOP56. Lors des étapes finales de la maturation des snoRNP C/D, il resterait à retirer RUVBL1/RUVBL2 ainsi que les facteurs ZNHIT6 et NUFIP1 (Bizarro et al., 2014). Au cours de sa maturation, la particule migrerait dans les « corpuscules de Cajal » avant d'être adressée vers les nucléoles (Verheggen et al., 2001, 2002).



Box C/D snoRNA



Box C/D snoRNP

Figure 15 : Structure des particules à petits ARNs nucléolaires à boîte C/D humain

Les motifs de reconnaissances sur l'ARN sont représentés sur la Figure de gauche par « Box C/D C' et D' ». A droite : la particule assemblée avec le snoARN et les protéines : SNU13, NOP56/58, fibrillarine (FBL).

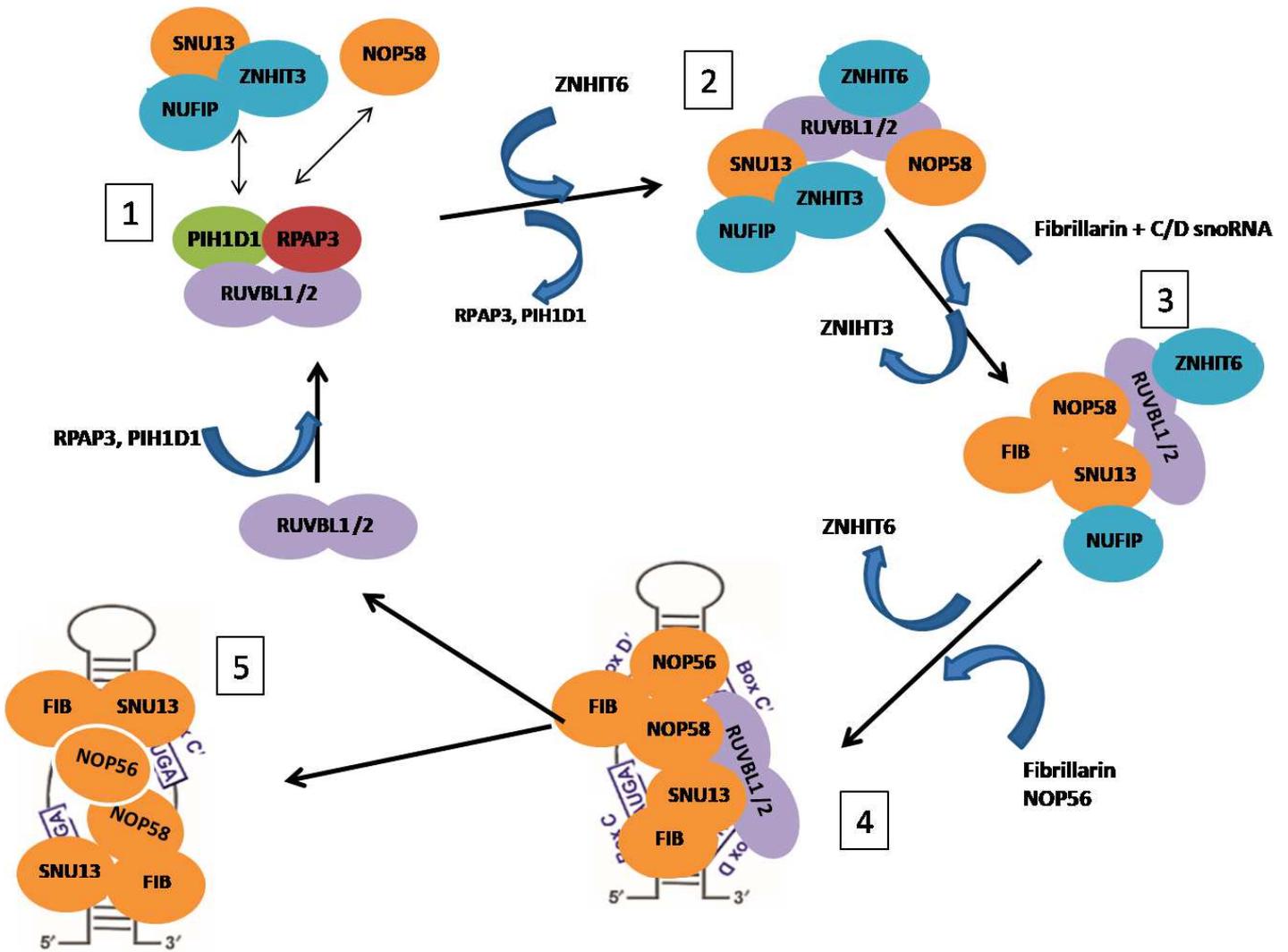


Figure 16: Modèle d'assemblage des petites particules ribonucléiques non codantes à boîtes C/D (snoRNP C/D).

(voir le texte plus haut)

Dans ce modèle, RUVL1 et RUVBL2 s'assemblent au dimère RPAP3-PIH1D1 pour former le R2TP. PIH1D1 recrute NOP58 ainsi que le trimère NUFIP-ZNHIT3-SNU13. RPAP3-PIH1D1 est libéré, et le reste des protéines forme en un premier pré-complexe protéique (2). ZNHIT3 se décroche, et la Fibrillarine (Fib) et le snoARN à boîte C/D sont recrutés sur le pré complexe (3). ZNHIT6 est libéré et l'ajout d'une seconde Fibrillarine et NOP56 est la dernière étape de cet assemblage. Les RUVBL sont libérées pour reformer le R2TP.

Cas particulier de La particule U4 du complexe d'épissage ("spliceosome")

Cette particule ribonucléo-protéique est composée d'un ARN non-codant dit «small nuclear ARN U4 » (snARN), qui comporte un motif dérivé des boîtes C/D et également structuré en K-turn et reconnu par la protéine SNU13. Un autre composant de la particule U4 est similaire à ceux des snoRNP à boîte C/D: il s'agit de la protéine PRP31, qui est très similaire aux protéines NOP56 et NOP58. L'assemblage des snoRNP C/D implique l'adaptateur NUFIP1, qui permet la liaison entre SNU13 et le complexe R2TP. Il a été montré que la protéine Prp31 de *S. cerevisiae* interagissait également avec Rsa1, l'homologue de NUFIP1. De plus, une forme mutée de la protéine PRP31 humaine empêche son incorporation stable dans la particule de U4, mais reste associée au R2TP et à NUFIP (Bizarro et al., 2015). Enfin, NUFIP se lie au complexe SMN, connu pour être impliqué dans la biogenèse des snARN (dont U4) en assurant le chargement des protéines Sm (communes aux snRNP) sur les snARN. Par conséquent, le système NUFIP1-R2TP associé au complexe SMN faciliterait l'assemblage de la particule snRNP U4 (Bizarro et al., 2015).

c) R2TP et assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA

Les mécanismes d'assemblages des snoRNP H/ACA ne sont pas non plus complètement élucidés, mais des interactions entre les protéines de la particule, des cofacteurs et le R2TP permettent d'émettre des hypothèses. Comme pour les C/D, la formation des snoRNP H/ACA fait intervenir un assemblage purement protéique avant la liaison à l'ARN, mais dans ce cas, la liaison à l'ARN a lieu pendant sa transcription. L'assemblage des H/ACA fait intervenir deux facteurs spécifiques: SHQ1 et NAF1. SHQ1 est un chaperon spécifique de la dyskérine, (Grozdanov et al., 2009), tandis que NAF1 ressemble à la protéine cœur GAR1 et la remplace dans les particules immatures (Leulliot et al., 2007). SHQ1 se lie à DKC1 très tôt dans la voie de biogenèse, et la prend en charge pour l'assembler avec les protéines NOP10, NHP2 et le cofacteur NAF1. NAF1 lie le domaine C-terminal de la grosse sous unité de l'ARN polymérase II, et il permettrait le ciblage de NOP10/NHP2 vers les snoARN H/ACA naissants. La dyskérine se lie de manière mutuellement exclusive à SHQ1 et aux H/ACA (Grozdanov et al., 2009; Yang et al., 2005), SHQ1 serait donc libéré de manière concomitante lors de la liaison de la dyskérine à l'ARN. L'étape qui suit serait la migration du complexe naissant vers les « corpuscules de Cajal », où NAF1 serait remplacé par la protéine GAR1 (Darzacq et al., 2006), permettant ainsi la formation d'un complexe fonctionnel (Li et al., 2011). Les protéines PIH1D1 et surtout RUVBL1/2 sont nécessaires à la dissociation de SHQ1 de la dyskérine, faisant probablement intervenir le R2TP à cette étape (Machado-Pinilla et al., 2012). Les mécanismes d'actions permettant la libération de SHQ1 de la dyskérine ne sont pas encore bien élucidés. On sait simplement que l'association entre ces deux protéines est extrêmement stable *in vitro* (Grozdanov et al., 2009).

Il faut noter que l'ARN qui sert de matrice à la télomérase pour allonger les télomères comporte des boîtes H/ACA qui s'associent avec les protéines canoniques des snoRNP H/ACA. Cet ARN appartient en fait à la famille des scaARN (small Cajal ARN), une famille dérivée des snoARN, qui s'associe avec les mêmes partenaires protéiques que les snoARN mais se localise dans les corps de Cajal (Jády et al., 2004). L'assemblage de ces particules emprunte vraisemblablement les mécanismes décrits pour la famille des snoRNP H/ACA et il y a des évidences solides indiquant que l'assemblage de la télomérase requiert le R2TP et en particulier les ATPases RUVBL1/2 (Boulon et al., 2008; Hoareau-Aveilla et al., 2006; Li et al., 2010; Venteicher et al., 2008; Wang et Meier, 2004).

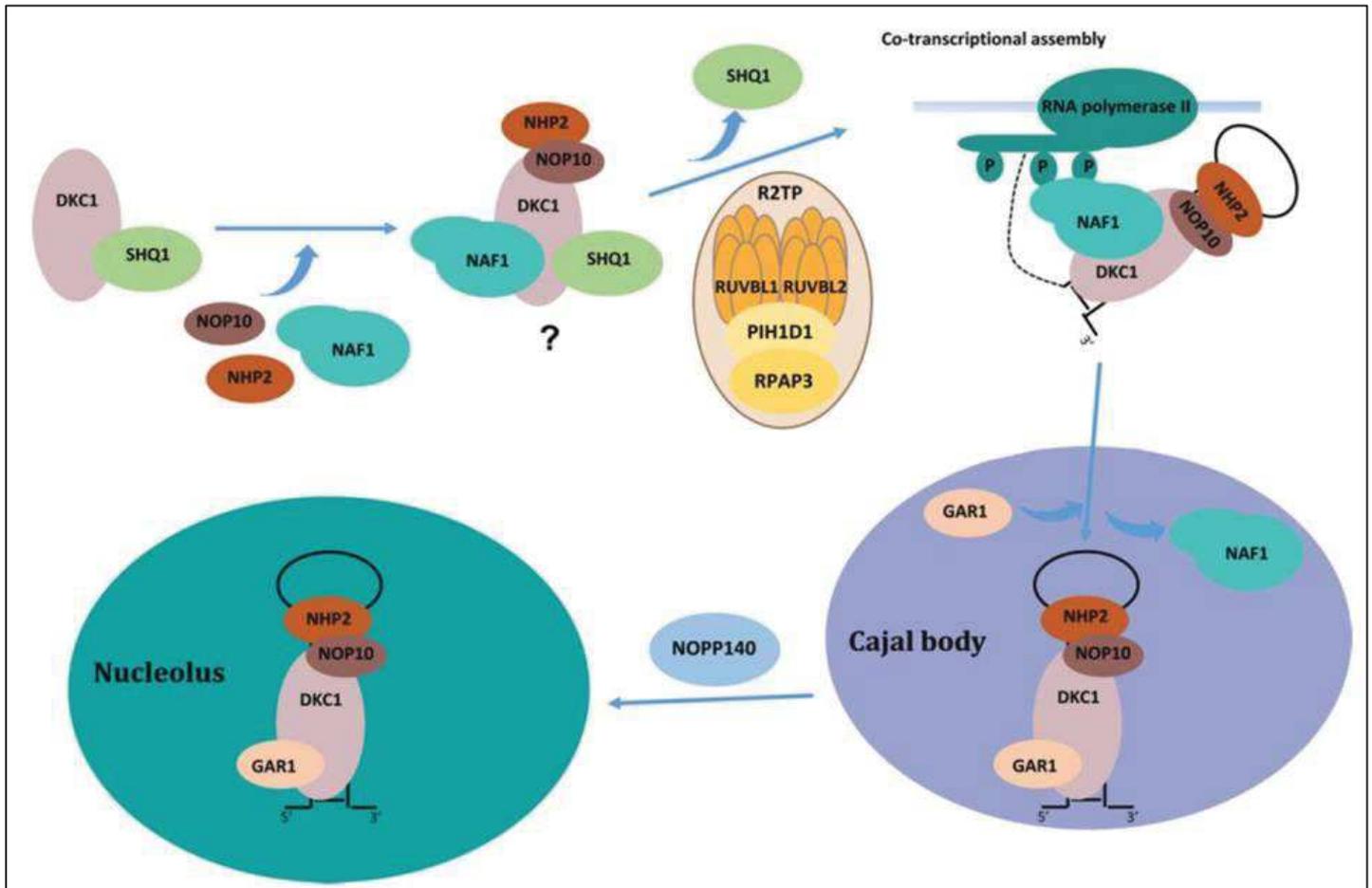


Figure 17 : Modèle d'assemblage des snoRNP à boîtes H/ACA issu de (Massenet et al., 2017) description voir le texte.

SHQ1 recrute la dyskérine (DKC1). L'étape suivante est l'assemblage des protéines NHP2 et NOP10 grâce au cofacteur NAF1 pour former la particule immature. Le R2TP interviendrait dans la dissociation de SHQ1 et FBL. Après l'incorporation de snoRNA à boîtes C/D, la protéine cœur GAR1 vient remplacer NAF1. NOPP140 est un facteur qui prend en charge la particule mature à sa sortie des « Cajal Body » pour l'amener vers le noyau.

d) Les autres substrats du R2TP

Depuis la découverte du R2TP, d'autres substrats ont été découverts : l'ARN polymérase II, les PIKK (Phosphatidylinositol-3 kinase related kinases), et les particules associées aux petits ARNs U4 et U5 de la machinerie d'épissage. Des expériences récentes de protéomique suggèrent de plus l'existence d'un grand nombre de substrats potentiels (Cloutier et al., 2017; Malinová et al., 2017).

(1) La particule snRNP U5.

Deux études protéomiques ont montré des complexes intermédiaires d'assemblage d'U5. Ceux-ci sont composés des protéines d'U5 PRPF8, EFTUD2 et SNRNP200, du complexe HSP90/R2TP, de son cofacteur ZNHIT2 et d'autres protéines moins caractérisées. Ces études démontrent que le R2TP prend en charge ces protéines de U5 avant leur assemblage avec le snARN, les stabilise et favorise la formation de la particule U5 (Cloutier et al., 2017; Malinová et al., 2017).

(2) L'ARN polymérase 2.

Cette enzyme fondamentale est composée de 12 sous-unités qui sont assemblées dans le cytoplasme avant que le complexe entier ne migre dans le noyau pour y assurer sa fonction. Notre équipe et celle de B. Coulombe ont montré que les sous-unités RPB1 (la plus grosse sous-unité du complexe) et RPB8 étaient associées au R2TP dans le cytoplasme de la cellule, avant leur incorporation avec les autres sous-unités de la polymérase, et que HSP90 stabilisait cette fraction de RPB1 cytoplasmique (Boulon et al., 2010; Cloutier et Coulombe, 2010). Ces données s'intègrent dans un modèle où RPB1 cytoplasmique, néosynthétisé, est pris en charge par HSP90, *via* le R2TP. Ceci permettrait son association avec les autres sous-unités de l'ARN polymérase II, elles-mêmes assemblées en pré-complexes grâce à d'autres facteurs d'assemblage spécifiques (Figure 19). L'ARN polymérase II correctement assemblée peut ensuite être importée dans le noyau, en particulier grâce à la protéine RPAP2 qui fait la navette entre les deux compartiments (Forget et al., 2013). Chez la levure *S.cerevisiae*, l'ARN polymérase II est associée dans le cytoplasme avec une protéine qui se place à l'interface d'interaction avec l'ADN pour diriger son import nucléaire (Czeko et al., 2011).

Ce résultat suggère qu'il existe probablement plusieurs facteurs d'import pour ce complexe

particulièrement gros. Ce modèle pourrait être étendu aux deux autres ARN polymérases, car des sous-unités de la polymérase I et III ont été trouvées associées au R2TP (Boulon et al., 2010; Cloutier et Coulombe, 2010). De plus, l'interaction entre le R2TP et la grande sous-unité de l'ARN polymérase I augmente lorsque l'assemblage de cette enzyme est bloqué (Boulon et al., 2010). Cependant, le rôle exact du R2TP reste encore à démontrer (Figure 18).

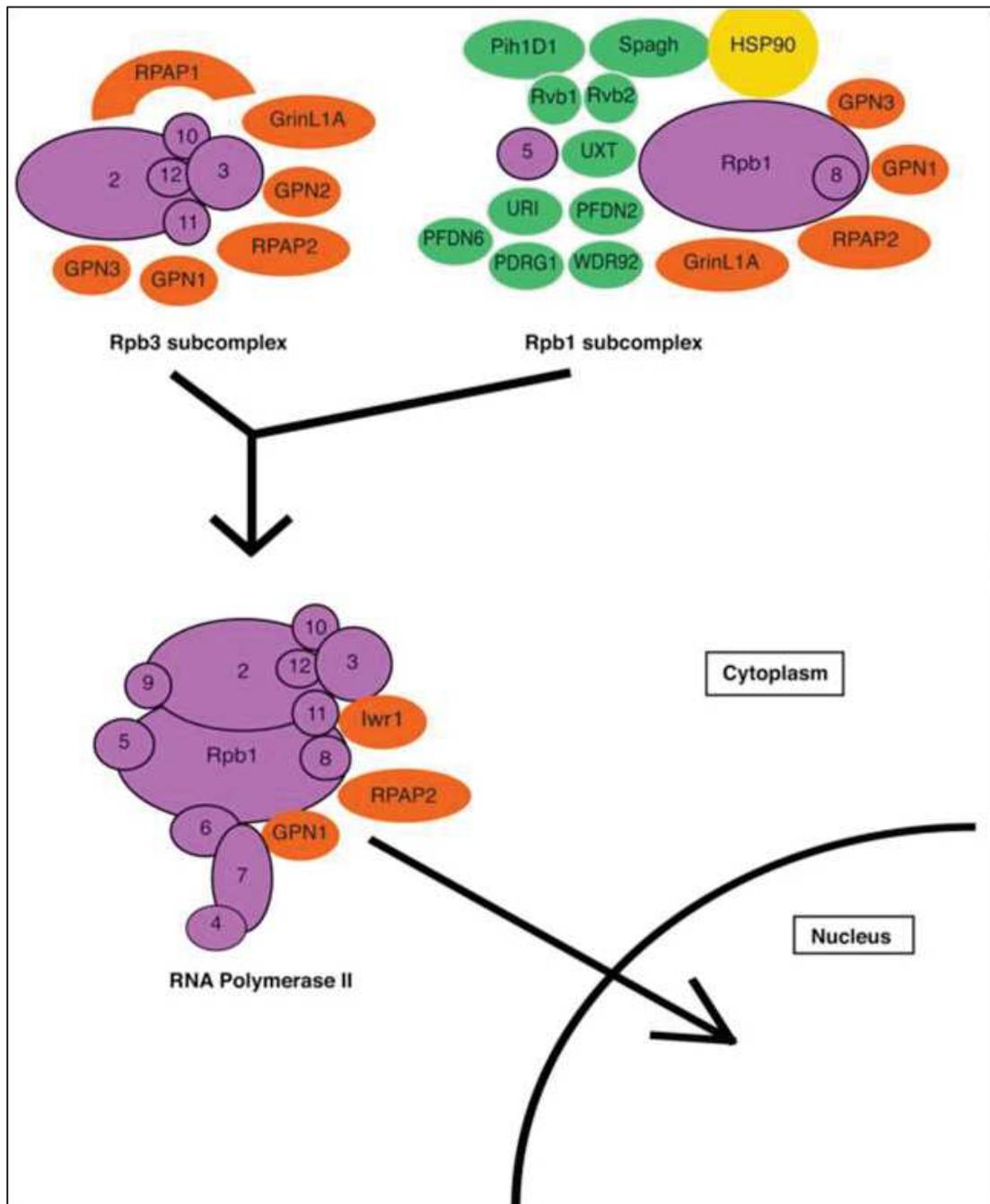


Figure 18 : Modèle d'assemblage des sous unités de l'ARN polymérase II

d'après (Boulon et al., 2012). Les sous unités de l'ARN polymérase II forment deux pré-complexes: un avec RPB1 et l'autre avec RPB2. Ces pré-complexes sont tous les deux associés à des protéines préfoldines (en vert) ainsi que d'autres facteurs d'assemblage dont la fonction est encore inconnue(en orange). Le pré-complexe contenant RPB1, pris en charge par R2TP, s'assemble avec le pré-complexe de RPB2 pour former un complexe mature de l'ARN polymérase II dans le cytoplasme avant de migrer dans le noyau.

e) L'adaptateur TTT et l'assemblage des PIKKs

La protéine Tel2 pour « Telomere length regulation protein 2 » a été identifiée chez *S. cerevisiae* pour son rôle dans le maintien de la longueur des télomères (Lustig et Petes, 1986). Cependant, il n'y a pas de preuve qu'elle puisse jouer le même rôle chez les mammifères. La délétion constitutive de son homologue chez la Souris (TELO2), est létale au stade embryonnaire, cette protéine est donc essentielle pour le développement (Takai et al., 2007). La délétion conditionnelle de TELO2 engendre une diminution des niveaux protéiques des six PIKK (PI3-Kinases-like Kinases) humaines, et ceci sans affecter les niveaux d'expression des ARNm respectifs (Takai et al., 2007). Les PIKK sont des grosses protéines ayant une activité kinase, et elles jouent des rôles particulièrement importants dans la physiologie cellulaire: ATM, ATR et DNA-PKc sont essentiels pour la réparations des cassures de l'ADN; mTOR est un point clé de contrôle de la croissance cellulaire en réponse aux nutriments, SMG1 fonctionne dans une voie de contrôle qualité des ARNm appelée NMD (Nonsense Mediated Decay), TRRAP fait partie de complexes de remodelage de la chromatine, et c'est la seules PIKK qui n'a pas d'activité kinase.

L'étude de protéomique de TELO2 a permis d'identifier des partenaires tels que des protéines du R2TP mais aussi de nouveaux acteurs. Ainsi TELO2 agit en complexe avec TTI1 et TTI2 («TELO2-interacting protein 1 /2 »), mais aussi avec la protéine chaperon HSP90. TELO2 lie préférentiellement les protéines nouvellement synthétisées, suggérant un rôle dans la maturation des PIKKs. De plus, TELO2 est nécessaire à l'incorporation de mTOR et ATR néo-synthétisées dans leurs complexes natifs respectifs (Takai et al., 2010). Le complexe TELO2-TTI1-TTI2 (TTT) se définit donc comme un nouveau co-chaperon d'HSP90 spécifique des PIKK. L'étude de Izumi (Izumi et al., 2010) suggérait également une implication des protéines RUVBL1 et RUVBL2 dans le maintien de la stabilité des PIKK. Enfin, il est apparu que la phosphorylation de TELO2 par la caséine kinase II (CK II) permettait de recruter le R2TP pour stabiliser les PIKK néo-synthétisées (Hořejší et al., 2010b; Pal et al., 2014). Cette phosphorylation a lieu sur deux sérines, présentes au sein d'un site consensus pour la kinase Caséine Kinase 2 (CK2; le consensus est DSDD/E). La mutation de ces sérines en alanines entraine une perte de l'interaction de TELO2 avec le R2TP alors que les liaisons aux PIKK restent intactes. Cette interaction est essentielle car lorsqu'elle est détruite, les PIKK ne s'accumulent plus dans les cellules (Hořejší et al., 2010a). Le complexe TTT serait donc un adaptateur permettant l'adressage du système R2TP/HSP90 aux PIKK, de manière similaire au complexe NUFIP/ZNHIT3 pour les snoRNP (Figure 19).

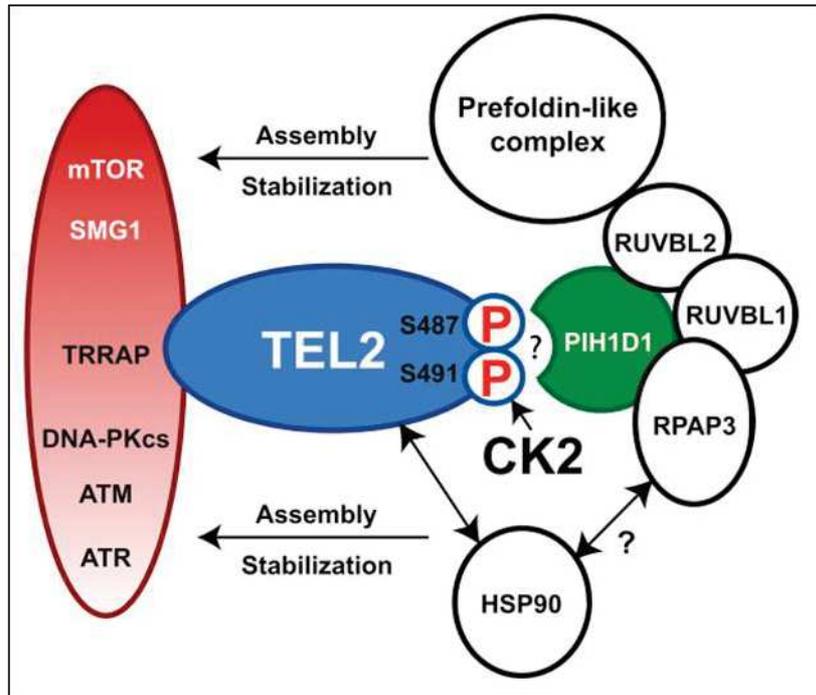


Figure 19 : Modèle d'interaction entre le complexe R2TP, HSP90 et TEL2

issu de (Hořejší et al., 2010b). Cette interaction n'est pas encore bien comprise mais il semblerait que le complexe

Le R2TP/préfoldines et HSP90 sont adressés aux PIKK via TEL2 (TEL2 sur le schéma). TEL2 est l'adaptateur spécifique des PIKK. Le point d'interaction avec TEL2 sur PIH1D1 est connu : c'est la lysine 64 qui reconnaît le motif DpSDD de TEL2 (voir dans le texte).

Une interaction directe entre HSP90 et TEL2 ou HSP90 avec les PIKK n'est pas exclue.

Sur ce schéma, l'interaction entre HSP90 et RPAP3 est marquée d'un point d'interrogation mais elle est à présent confirmée.

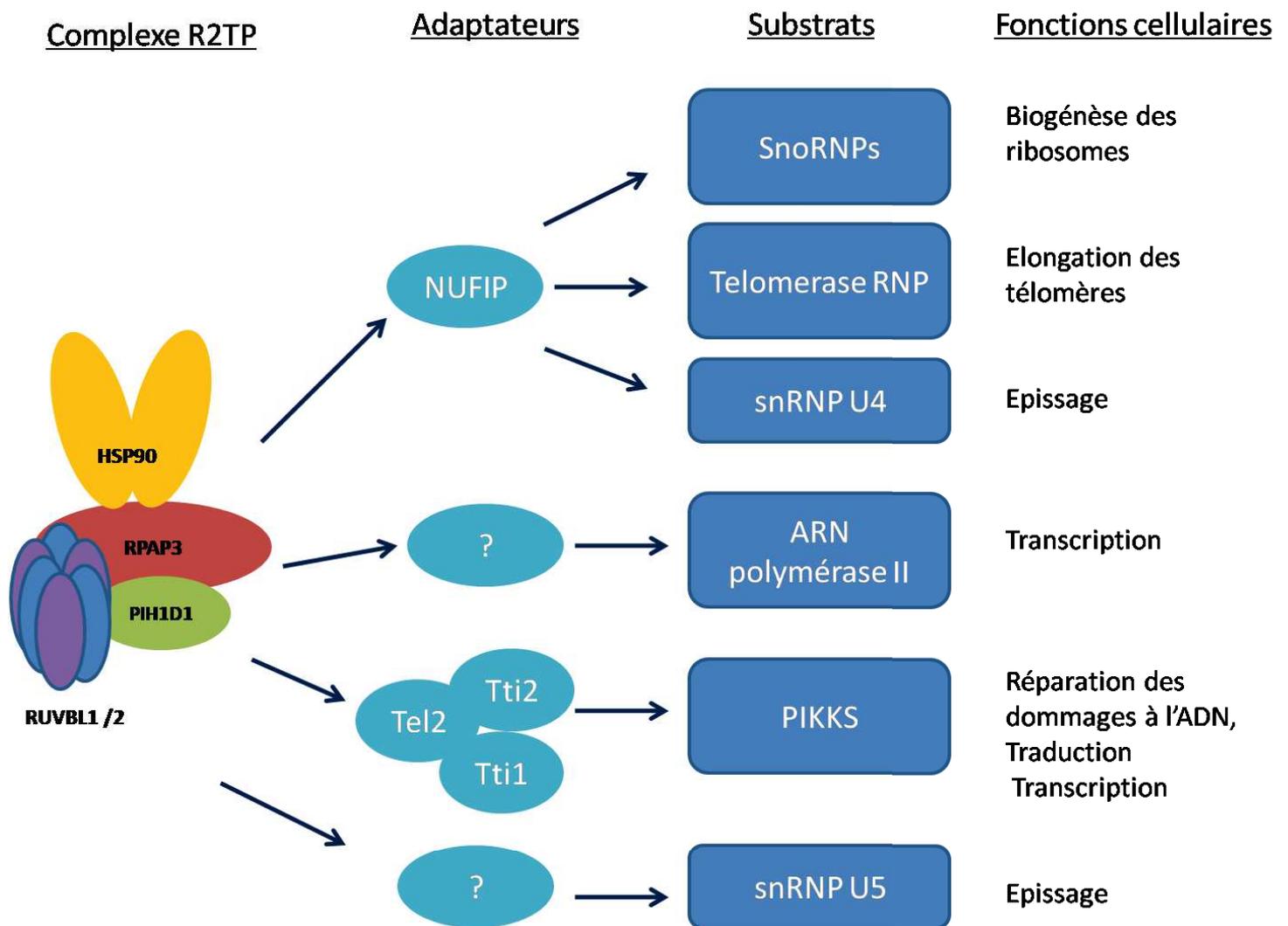


Figure 20 : Schéma représentant les clients d'HSP90 dépendant du R2TP.

A gauche, le complexe R2TP composé des RUVBL1/2, PIH1D1 et RPAP3, associé à HSP90.

En turquoise, une série d'adaptateurs secondaires (NUFIP, TEL2/TTI1/TTI2) spécifiques à des classes de substrats du R2TP, et en bleu foncé les clients. Ces clients nouvellement identifiés

démontrent des implications jusqu'à alors insoupçonnées de HSP90 dans les fonctions cellulaires correspondantes. L'association de ces co-chaperons et leur mode d'action ne sont pas encore tous élucidés.

4. Modèle général d'action du complexe R2TP

Lorsque j'ai commencé ma thèse, de nombreuses questions restaient en suspens, notamment (Figure 21) :

- Comment PIH1D1, d'une part, et RPAP3/RUVBL1/2 interagissent ?
- Comment sont recrutés les partenaires des substrats recrutés par le domaine PIH1 de PIH1D1 ?
- On pensait que la sous-unité annoté B ici était amenée par HSP90 mais on ne savait pas exactement comment elle était incorporée au complexe final.
- Comment est régulée l'activité des RUVBL1/2 et quelle est leur fonction au sein du complexe R2TP ?

Mon travail a contribué à répondre à certaines de ces questions.

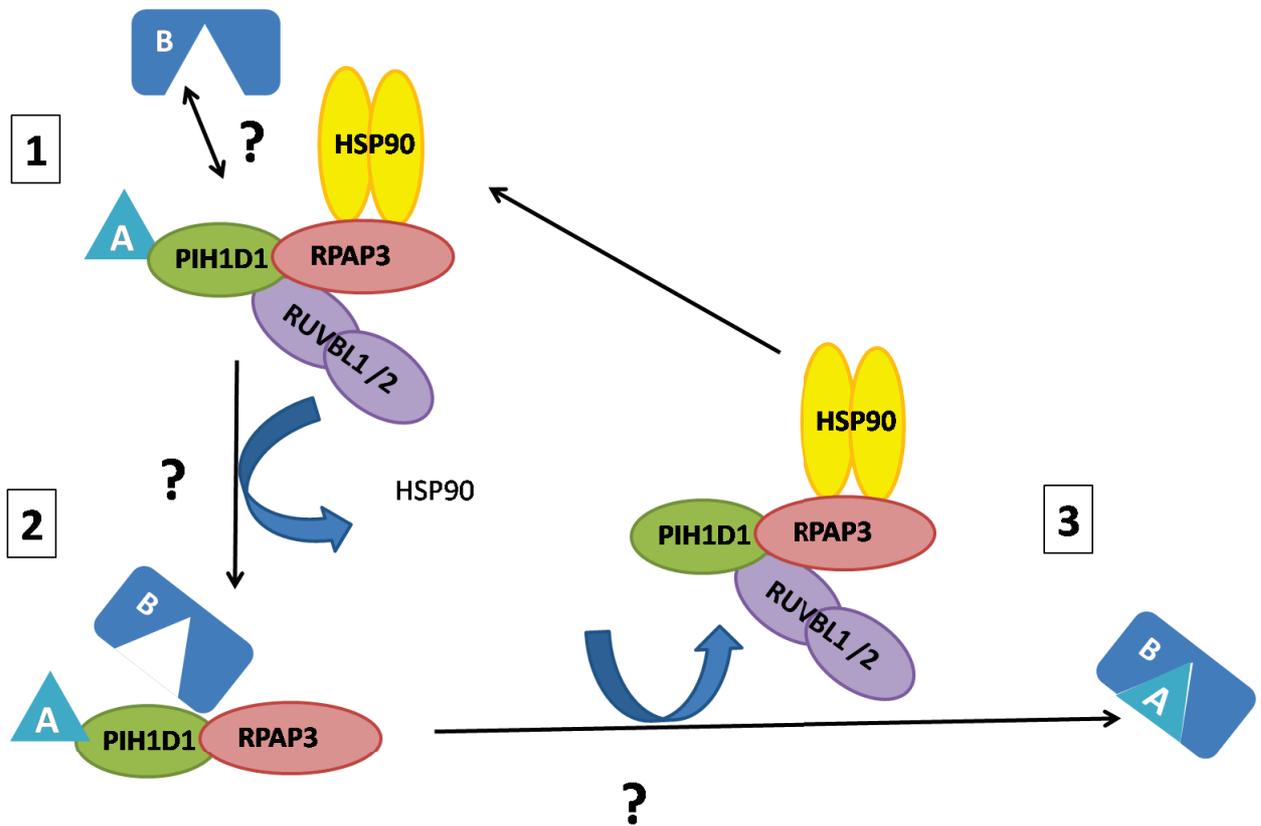


Figure 21: Modèle général d'assemblage des complexes macromoléculaires par le R2TP

Ce schéma représente la vision de l'assemblage des complexes par R2TP avant ma thèse.

1) HSP90 s'occuperait du repliement de certaines sous-unités ici (B) qu'elle présente au complexe R2TP. Le R2TP prendrait en charge directement une autre catégorie de sous-unité (A) via le domaine N-terminal de PIH1D1. 2) Le recrutement des autres sous-unités (B) n'est pas clair. L'interaction entre RPAP3 et HSP90 permettrait le chargement des sous-unités B sur le R2TP, HSP90 serait alors libérée. 3) Le R2TP assurerait l'assemblage des sous-unités. Le R2TP et le complexe AB nouvellement assemblé se dissocient.

5. Les protéines PIH-like et RPAP3-like.

Il existe d'autres protéines ayant un domaine apparenté au domaine PIH défini chez Pih1p/Pih1D1 : PIH1D2, PIH1D3, DNAAF2/Kintoun (Figure 22). La variété des protéines à domaine PIH chez les différents organismes a été corrélée avec la présence de cils mobiles chez ces mêmes organismes (Yamamoto et al., 2010). Ainsi la protéine Kintoun/DNAAF2 a été identifiée pour son rôle indispensable dans l'élaboration de cils mobiles (Omran et al., 2008). Elle permet l'assemblage des dynéines en interaction avec une protéine, DYX1C1, à domaine TPR comme RPAP3. DNAAF2/DYX1C1 forment un complexe d'assemblage qui recrute le chaperon HSP70 dans le cytoplasme (Tarkar et al., 2013). Le mode d'action rappelle celui du R2TP dans l'assemblage de l'ARN polymérase II : les dynéines, une fois assemblées, migreraient vers leur site d'action, les cils mobiles (Figure 23).

D'autre part, les génomes des mêmes organismes codent également pour des protéines dont la structure s'apparente à celle de RPAP3 : SPAG1 et CCDC103 (Figure 22). Notamment, ces protéines comportent des domaines similaires au domaine C-terminal de RPAP3. Ces protéines ont été identifiées chez des patients présentant des défauts de ciliogénèse motile, résultant dans un ensemble de maladies multifactorielles regroupées sous le nom de "dyskinésies primaires du cil" (Dong et al., 2014; Panizzi et al., 2012; Tarkar et al., 2013).

Enfin les protéines RUVBL1/2 ont été impliquées par plusieurs études dans la ciliogénèse (Raidt et al., 2014; Zhao et al., 2013). Il est donc tentant de proposer que ces protéines à domaine PIH interagissent avec des protéines à domaines RPAP3-Cter et les RUVBL1/2 pour former des complexes apparentés aux R2TP. L'intérêt pour l'analyse des modes d'action du R2TP n'en serait que renforcé.

Une partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude de la structure et de la fonction de ces complexes potentiels, en collaboration avec l'équipe "ARN, RNP, maturation-structure-fonction" du laboratoire IMoPA de Nancy. (cf. section "Résultats 2").

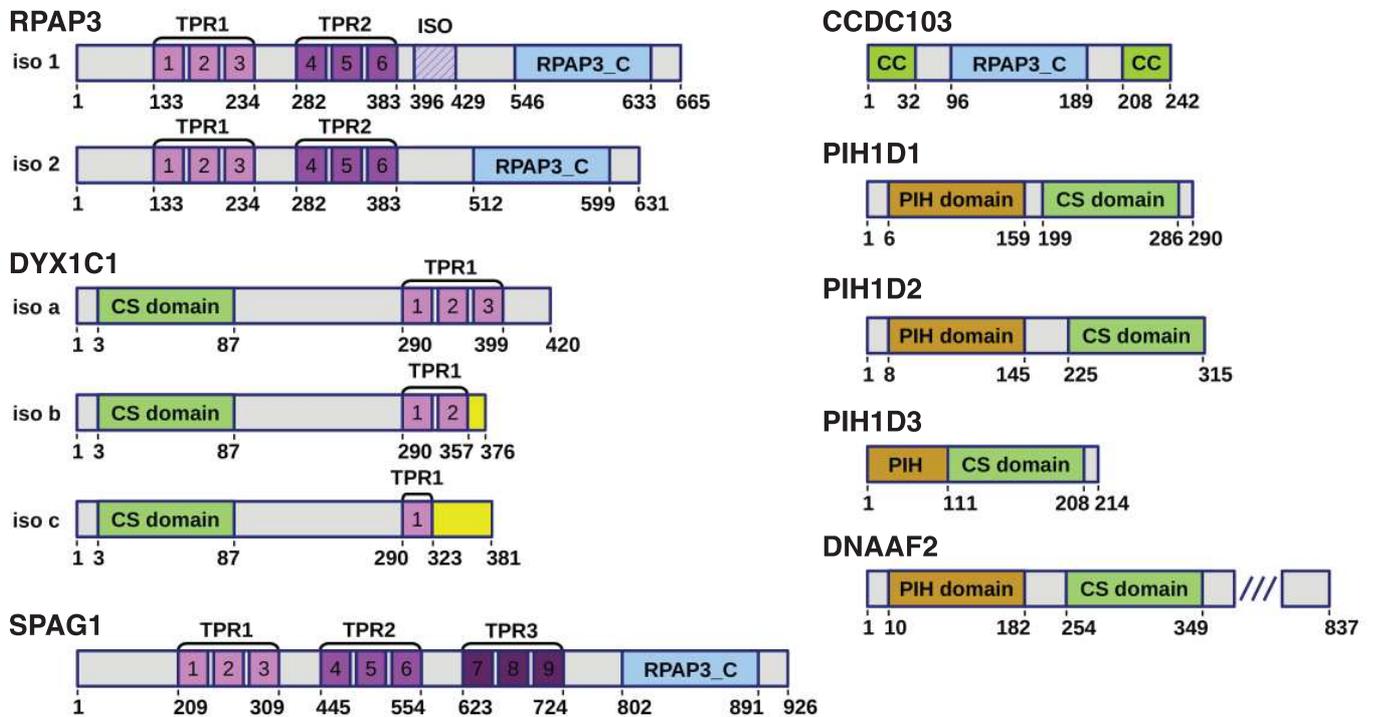


Figure 22 : Structure des protéines RPAP3-like et PIH-like (issu du manuscrit n°2)

Le domaine C-terminal de RPAP3 est conservé chez SPAG1 et CCDC103.

Comme RPAP3, SPAG1 et DYX1C1 présentent des domaines TPR connus pour interagir avec les motifs C-ter des chaperons HSP90 et HSP70.

DYX1C1 est également composé d'un domaine CS, tout comme les protéines à domaine PIH.

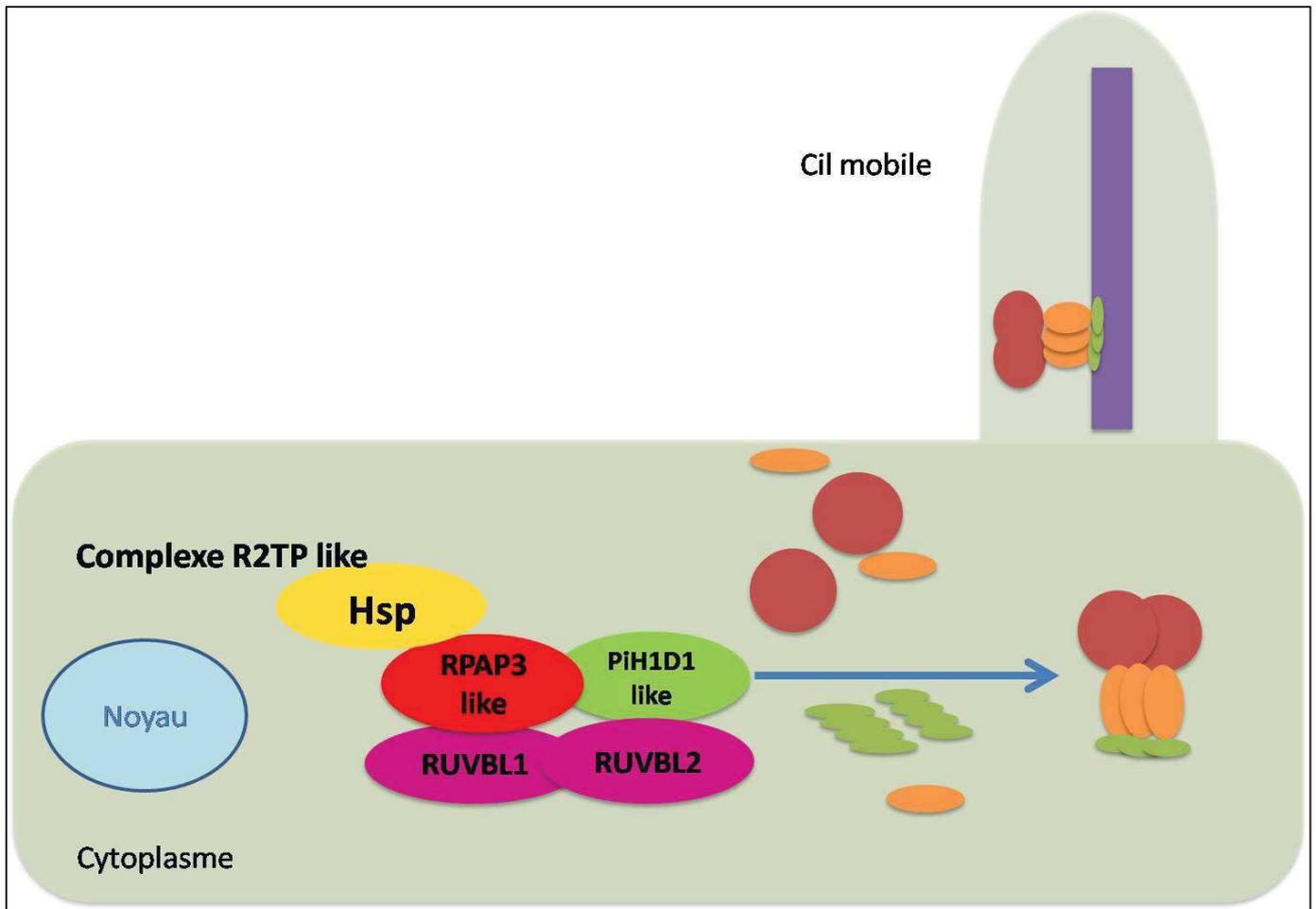


Figure 23: Modèle d'assemblage des dynéines.

Le modèle que nous proposons est basé sur celui de l'assemblage de l'ARN polymérase II : dans le cytoplasme, les différentes sous unités des dynéines seraient assemblées par un complexe R2TP-like. Ce complexe serait composé d'un chaperon (HSP70 ou HSP90) relié à une protéine RPAP3-like par des domaines TPR, d'une protéine à domaine PIH, et des ATPases RUVBL1 et RUVBL2. Les dynéines, une fois assemblées, seraient incorporées dans le cil.

6. HSP90, les RUVBL et le R2TP dans le cancer.

Du fait de leur rôle dans le R2TP et les complexes de remodelage de la chromatine, les RUVBL sont des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. En particulier, elles jouent des rôles importants dans la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses (Dugan et al., 2002; Wood et al., 2000), en particulier dans les hépato-carcinomes (Berasain, 2010; Grigoletto et al., 2013; Haurie et al., 2009; Raymond et al., 2015), et encore dans l'apoptose. L'activité oncogénique des RUVBL a été mise en relation avec leur rôle de cofacteur des facteurs de transcription oncogéniques tel que c-Myc ou la β -caténine, mais leur mécanisme d'action dans la tumorigénèse reste encore très mal compris. A cet égard, il est important de noter que le R2TP intervient dans divers processus biologiques qui sont impliqués dans la croissance cellulaire et la tumorigénèse. La transcription, la biogenèse des ribosomes, la traduction, l'élongation des télomères ou encore les dommages à l'ADN, sont autant de fonctions nécessaires à la prolifération et la croissance cellulaire. Une dérégulation de ce système pourrait entraîner des dommages importants. Certains de ces substrats comme mTOR sont bien connus pour contrôler la croissance cellulaire et sont impliqués dans des cancers colorectaux (Gulhati et al., 2009). Récemment, un lien entre le R2TP et le complexe TSC a été mis en évidence (Cloutier et al., 2017; Malinová et al., 2017). Le TSC est le régulateur principal de mTOR et c'est un suppresseur de tumeurs bien connu. Comme on le voit, les liens entre le R2TP et le cancer sont nombreux.

Le R2TP est un cofacteur de HSP90, et cette chaperonne est bien connue pour être une cible thérapeutique dans de nombreux cancers: pas moins d'une vingtaine d'inhibiteurs sont en cours de test cliniques (Jhaveri et al., 2012). Le R2TP adresse HSP90 vers des substrats dont certains sont surexprimés dans des cancers, donc il pourrait être lui aussi une cible thérapeutique. HSP90 a de nombreux clients dans beaucoup de voies de signalisations différentes: cibler le R2TP permettrait de restreindre la déstabilisation à des clients oncogéniques pour éviter d'affecter les clients de HSP90 anti-oncogéniques. De fait, l'hypothèse d'un rôle du R2TP dans la carcinogénèse via les snoRNP et snRNP émerge (Kakihara et Saeki, 2014).

Une partie de ma thèse a consisté à mettre au point un système d'inactivation du gène codant pour RPAP3 chez la souris afin d'inactiver le R2TP. Ce modèle a pour but de nous permettre de mieux caractériser la fonction de *RPAP3* et du complexe R2TP dans un organisme, puis en ciblant l'intestin, de l'étudier dans un tissu en prolifération continue. De plus, grâce à ce modèle, nous pourrions tester l'hypothèse de l'implication du *RPAP3* et donc du R2TP dans l'établissement de cancers intestinaux.

C. L'intestin comme organe d'étude de la prolifération

1. Le rôle de l'intestin

Chez la souris comme chez l'Homme, le tractus digestif est issu du feuillet embryonnaire endodermique. Il se compose de deux grandes parties : l'intestin grêle et le gros intestin ou côlon et se termine par le rectum. L'intestin grêle comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est lui aussi divisé en trois parties, le côlon ascendant, transverse et descendant (Figure 24 et 26).

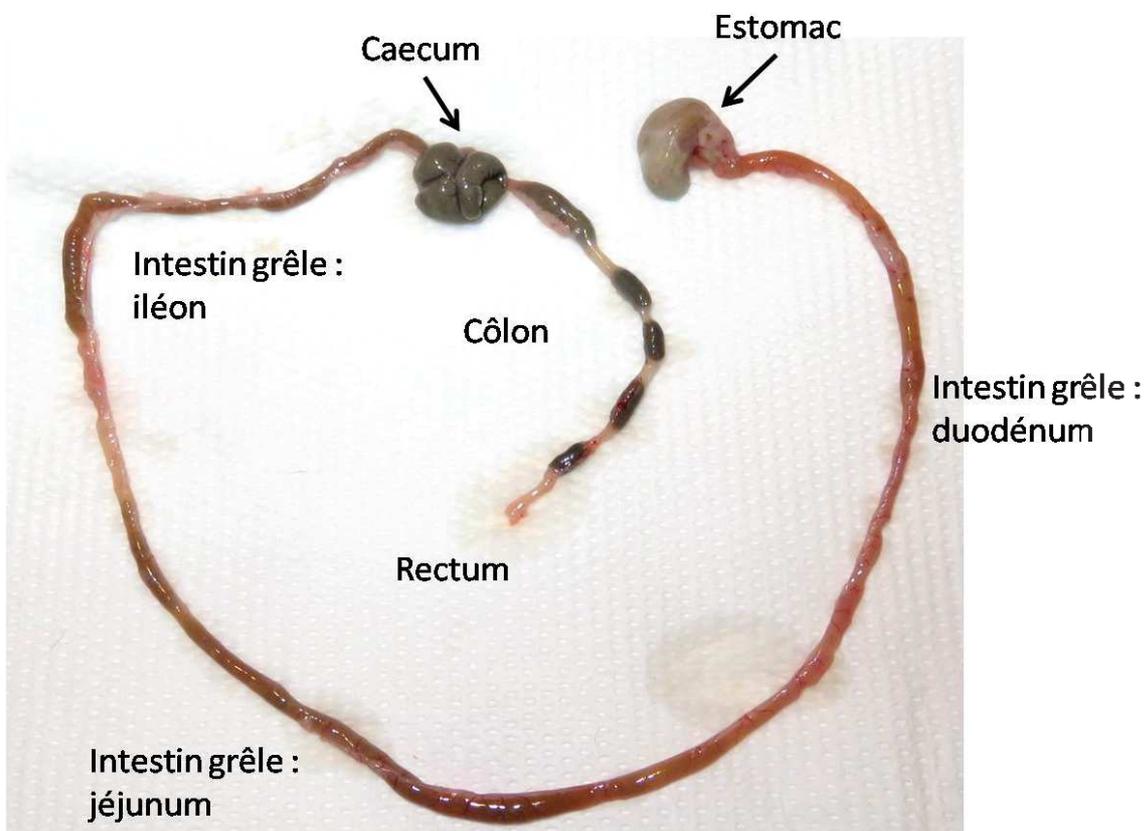


Figure 24 : Photo du tractus digestif d'une souris $RPAP3^{+/+}$.

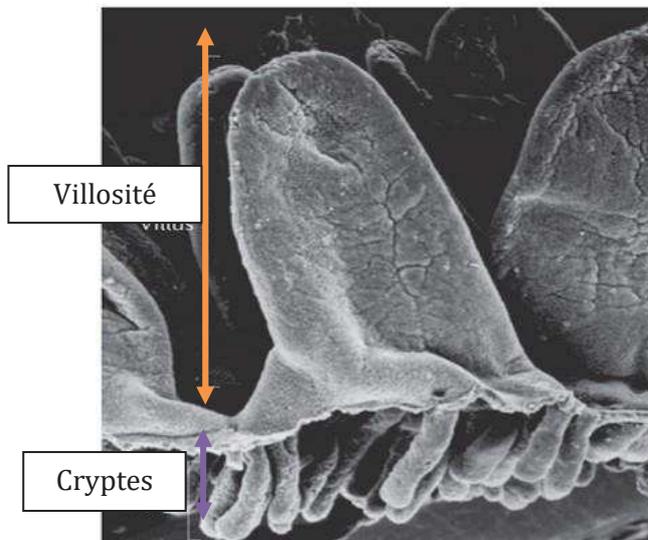
L'intestin grêle est un organe d'échange : sa fonction première est de digérer les aliments pour en extraire le maximum de nutriments et d'eau nécessaires au fonctionnement du corps. Ces fonctions sont assurées par des cellules de l'épithélium appelées entérocytes. Les cellules intestinales sont en contact direct avec l'extérieur (la lumière de l'intestin). Afin d'augmenter la surface d'échange, l'épithélium intestinal forme une succession de villosité. A chaque villosité sont associées plusieurs invaginations appelées cryptes de Lieberkühn comme illustré dans la Figure 25 (Barker, 2014). Ces cryptes abritent notamment, à leur base, les cellules souches intestinales à l'origine de tous les types cellulaires de l'épithélium. Dans le duodénum, les villosités sont plus longues que dans les autres parties de l'intestin. La plus grande partie de la digestion et réabsorption se fait au niveau de l'intestin grêle.

Les villosités rétrécissent le long du tractus pour disparaître dans le côlon (Figure 25b et 26). Celui-ci a essentiellement une fonction mécanique de compaction des selles et de leur excrétion. De fait, les cellules sécrétrices de mucus, les cellules caliciformes, y sont plus nombreuses que dans l'intestin. Elles sont détectées par un marquage à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui colore les gouttes de mucus en violet foncé (Figure 26).

L'épithélium intestinal est à l'interface entre le milieu extérieur et intérieur: il est donc soumis en permanence aux agressions des pathogènes contenus dans le bol alimentaire. L'épithélium doit donc aussi jouer un rôle dans la défense immunitaire en constituant une barrière. Des cellules spécialisées assurent un dialogue avec le système immunitaire pour répondre à d'éventuelles attaques et assurer la régénération de l'épithélium après un épisode inflammatoire (Gerbe et al., 2016).

Toutes ces différentes fonctions (absorption, sécrétion de mucus, réponse à l'agression pathogènes...) sont portées par des cellules spécialisées.

a) Intestin grêle



b) Côlon

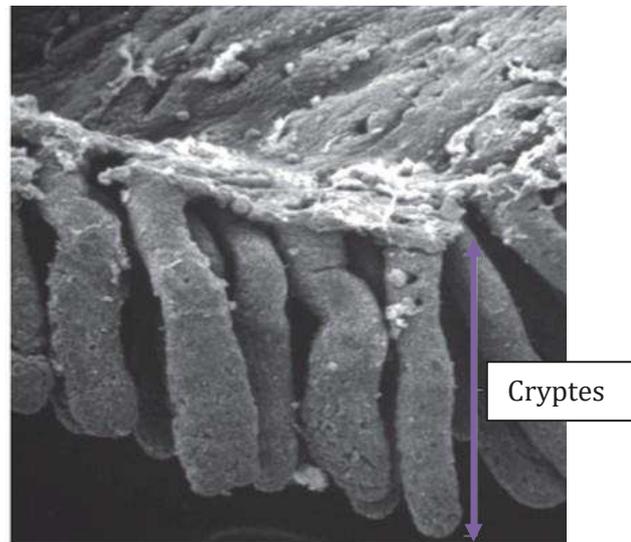


Figure 25 : Image de l'épithélium de l'intestin grêle (a) avec les villosités et les cryptes, et en (b) image de l'épithélium au niveau du côlon.

Image de microscopie électronique, issue de (Barker, 2014)

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium est composé d'un enchainement de villosités et des cryptes contrairement à celui du côlon qui ne contient que de cryptes.

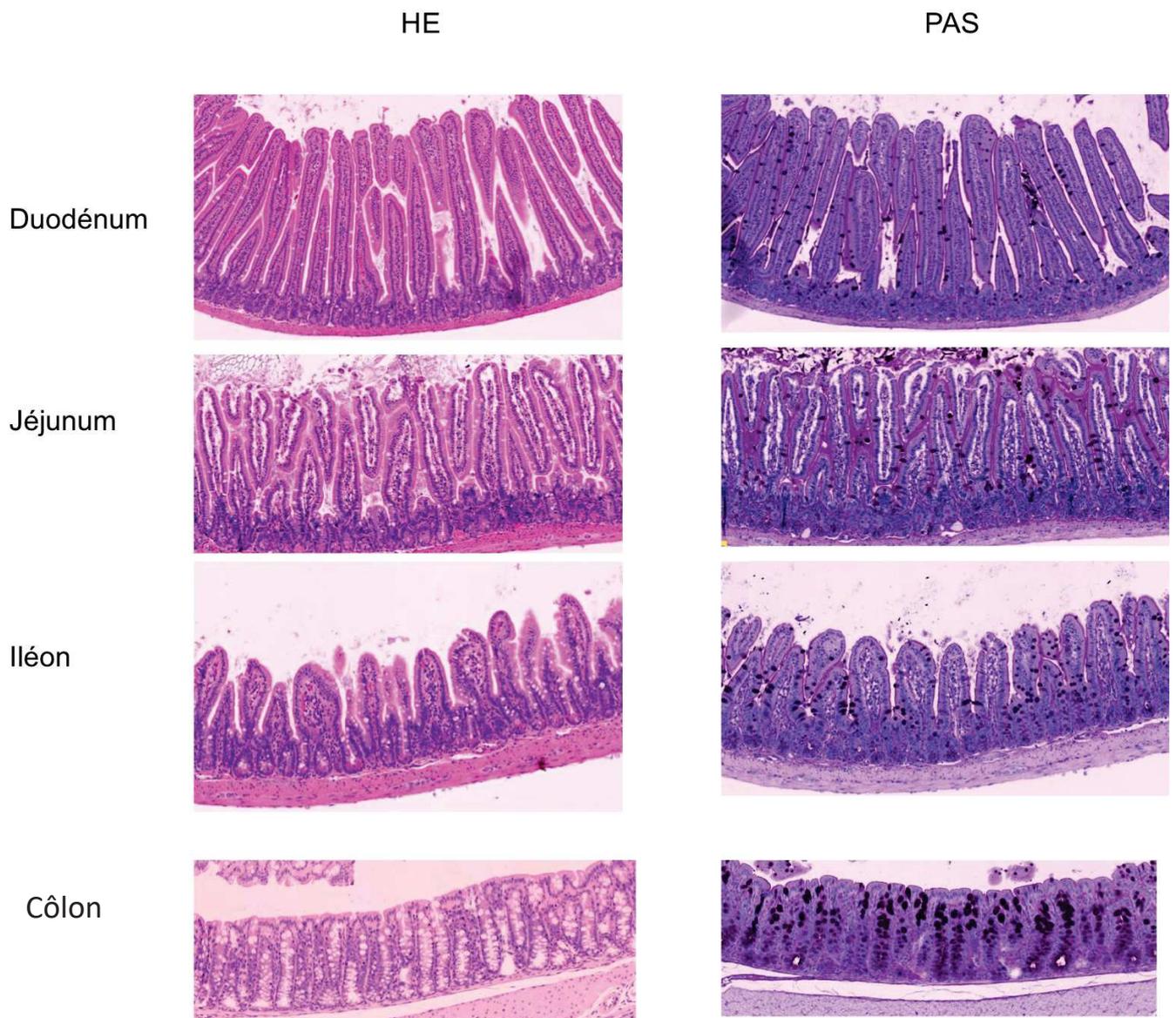


Figure 26: Coloration à l'Hématoxyline-Eosine (panneau HE) et à l'Acide Périodique de Schiff (panneau PAS) de coupes d'épithélium intestinal de souris. Les villosités sont plus grandes dans le duodénum, elles rétrécissent au fur et à mesure du tractus et finissent par disparaître au niveau du côlon. Le marquage au PAS met en évidence les cellules caliciformes en violet foncé. Ces cellules sont plus nombreuses au niveau de l'épithélium du colon en comparaison avec l'intestin grêle.

2. Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est composé de plusieurs types cellulaires :

- Les cellules souches « CBC » à l'origine des différents types de cellules de l'épithélium
- Les cellules souches « +4 » ou CP4
- les entérocytes
- Les cellules sécrétrices
 - les cellules caliciformes,
 - les cellules entéroendocrines
 - les cellules de Paneth
 - les cellules Tuft
- les « cup cells » ou cellules en forme de coupe, peu décrites,
- les cellules « M » associées aux plaques de Peyer, des nodules lymphatiques apposés le long de la paroi intestinale.

(Figure 27)

a) Les cellules souches

Les cellules souches de la base des cryptes sont appelées les CBC pour « Crypt Base Columnar Cells » (Cheng et Leblond, 1974). Elles sont intercalées de cellules de Paneth. Etant à l'origine de toutes les cellules de l'épithélium, elles sont donc multipotentes. Du fait du renouvellement rapide de l'épithélium, les CBC entrent en division fréquemment, ce qui les rend sensibles aux radiations, contrairement aux cellules souches « +4 » que nous verrons après. Les cellules CBC se distinguent par l'expression de marqueurs dont les plus connus sont : LGR5 (Barker et al., 2007), *Ascl2* (van der Flier et Clevers, 2009) et *Olfm4* (van der Flier et al., 2009a). LGR5, pour « Lucine rich repeat containing G protein coupled Receptor 5 », est un récepteur transmembranaire aux R-spondines, des agonistes de la voie Wnt. Il est lui-même contrôlé par cette voie. Le marqueur LGR5 est exprimé spécifiquement par les cellules souches CBC, localisées au fond des cryptes mais pas par les autres cellules souches "+4". L'activation de la voie Wnt est cruciale pour le maintien des CBC.

Plusieurs études ont confirmé le rôle d'*Ascl2* comme marqueur des cellules souches CBC. *Ascl2* (pour Achaete Scute-Like2) est un facteur de transcription impliqué dans le devenir des cellules souche. En son absence, les CBC disparaissent au bout de quelques jours: il est donc nécessaire à leur maintien (van der Flier et al., 2009b). *Ascl2* est aussi un gène cible de la voie Wnt. Sa transcription est activée par cette voie et subit une auto-activation par la protéine ASCL2.

Olfm4 (Olfactomedin 4) est lui aussi un marqueur des cellules souches CBC mis en évidence en 2009 (van der Flier et al., 2009a). Chez l'homme, les cellules de la base des cryptes expriment ce marqueur alors que chez la souris, l'expression est cantonnée aux cryptes de l'intestin grêle. Mais le signal est localisé à la même position dans les cryptes coliques humaines et les cryptes intestinales murines : dans les cellules CBC. Olfm4 est exprimé en réponse à la voie Notch et joue un rôle dans l'adhésion tissulaire (Figure 28).

Les cellules souches « +4 » ou CP4 ont été identifiées par Potten (Potten et Hendry, 1975). Ces cellules sont quiescentes jusqu'à ce que l'épithélium ait besoin d'elles, comme dans le cas d'une perte des cellules CBC. Les cellules souches « +4 » sont alors capables de régénérer la production des cellules intestinales soit en se dédifférenciant en CBC, soit en se différenciant directement sans passer par l'état de cellules souches LGR5⁺. (Tian et al., 2012)

Comme l'indique leur nom, elles se situent juste au dessus de la base de cryptes après les cellules de Paneth et les CBC en position +4 (Figure 28, en orange). Elles se caractérisent par l'expression de 4 marqueurs principaux : Bmi1 (Sangiorgi et Capecchi, 2008; Yan et al., 2012) , Hopx (Takeda et al., 2011), mTERT (Montgomery et al., 2011), Lrig1 (Powell et al., 2013). Ces études montrent que les cellules des cryptes exprimant simultanément ces quatre marqueurs, les "+4", sont capables de régénérer le stock de cellules souches LGR5⁺. Certains de ces marqueurs, comme Lrig1, peuvent aussi être exprimés par les cellules CBC (Muñoz et al., 2012).

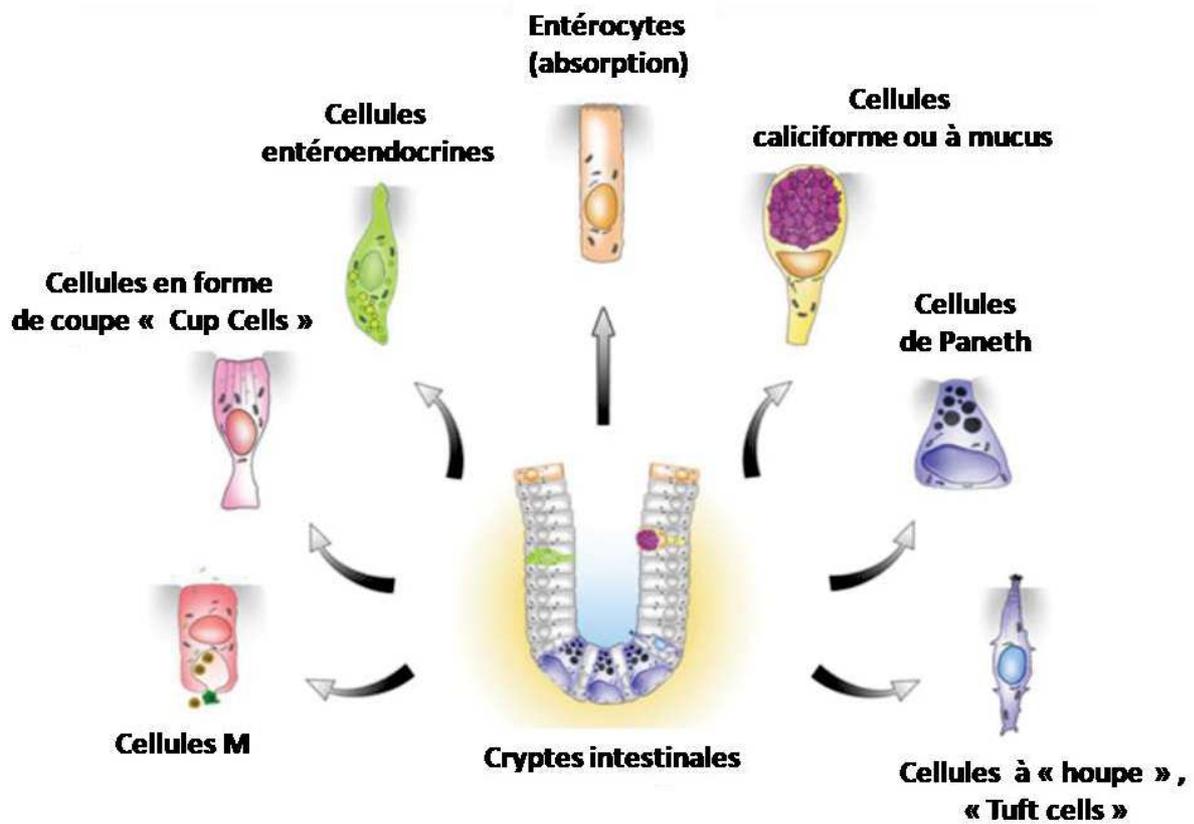


Figure 27 : Représentation schématique des types cellulaires connus de l'épithélium intestinal

Schéma adapté à partir de l'article (Gerbe et al., 2012)

Les cellules souches du fond des cryptes, appelées CBC, peuvent donner en se différenciant pratiquement toutes les cellules intestinales épithéliales représentées ici : les entérocytes, les cellules sécrétrices : cellules de Paneth, cellules à mucus, les cellules « cups » et « tuft »

b) Les cellules de l'absorption

Les entérocytes sont les cellules les plus abondantes dans l'épithélium de l'intestin grêle. Elles sont responsables d'une partie de la digestion du bol alimentaire grâce à la libération d'enzymes dans la lumière de l'intestin. Elles assurent l'absorption des nutriments et de l'eau. Cette fonction est assurée par la présence de microvillosités sur la surface en contact avec les aliments. Elles sont polarisées : le pôle apical présente des microvillosités et le pôle basal accueille le noyau. La membrane des entérocytes présente différents transporteurs de nutriments et eau, notamment du glucose. Ils permettent aussi l'entrée d'ions dans la cellule, accompagné de glucose, puis le glucose est déversé dans les capillaires sanguins. Ces cellules ont une durée de vie de 3- 4 jours.

c) Les cellules sécrétrices

Les cellules entéroendocrines sont des cellules polarisées présentant sur leur pôle apical des microvillosités et sur leur pôle basal des granules sécrétoires. Elles ne sont pas regroupées dans un compartiment mais disséminées le long du tractus dans l'épithélium. Elles se situent en générale dans les cryptes et à la base des villosités. Ces cellules jouent un rôle dans le dialogue inter-organe au cours de la digestion, *via* la sécrétion d'hormones. Les hormones sécrétées sont principalement des hormones peptidiques telles que la sécrétine ou le peptide YY. Ces hormones agissent sur la digestion mais aussi sur la coordination des mouvements péristaltiques pour faciliter le passage du bol alimentaire.

Les **cellules caliciformes** sécrètent le mucus qui facilite le passage des aliments le long du tractus. Ce mucus est stocké dans une vacuole avant d'être déversé dans la lumière de l'intestin. Ces cellules sont peu nombreuses dans l'intestin grêle contrairement au côlon, où elles sont indispensables. Le mucus a un rôle de protection de l'épithélium mais aussi un rôle mécanique en favorisant le glissement des aliments (voire même des parasites) lors de l'excrétion. Ce mucus est détecté par un marquage à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui colore les gouttes en violet foncé (Figure 26, PAS)(Gerbe et al., 2012).

Les **cellules de Paneth** se situent au fond des cryptes de l'intestin grêle, intercalées entre les cellules souches CBC (Garabedian et al., 1997)(Figure 28). Les cellules de Paneth expriment le marqueur CD24 à leur membrane. Elles auraient un rôle dans le maintien d'une niche favorable pour le maintien des CBC car elles expriment des facteurs paracrines : signaux des voies EGF, Wnt, Notch, tous indispensables au maintien des CBC (Sato et al., 2011). Cependant, elles ne sont pas indispensables à la survie des CBC ni au maintien de l'épithélium ,

que ce soit en conditions d'homéostasie, de régénération ou de tumorigenèse (Durand et al., 2012). Les cellules de Paneth assurent aussi un rôle dans l'immunité au sein de l'intestin. En effet, elles sécrètent des particules antimicrobiennes et des lysozymes qui préservent l'intégrité de l'épithélium au regard des pathogènes présents dans les aliments.

Les cellules « Tuft » ont été caractérisées pour la première fois dans l'épithélium de la trachée chez le rat puis dans celui de l'estomac de la souris. Leur fonction n'est pas encore bien connue mais des études récentes les classent dans la catégorie des cellules sécrétrices. En réponse à une infection parasitaire, elles sécrètent de l'interleukine IL-25 pour initier une réponse immunitaire de type II, qui favorise la production d'anticorps par les cellules B. Dans le cas d'une infection par le parasite Helminthe, elles permettent de déclencher la réponse immunitaire et une hyper-prolifération des cellules caliciformes. La production de mucus qui en résulte permet alors l'élimination des parasites du tractus intestinal (Gerbe et al., 2012, 2016).

d) Autres cellules

Les cellules « cup », sont des cellules dont la forme fait penser un verre à pied. Elles possèdent des microvillosités et représentent environ 6% des cellules de l'épithélium intestinal. Leur fonction est encore méconnue.

Les cellules M, situées entre l'épithélium et les plaques de Peyer, ont un rôle d'interlocuteur entre les cellules intestinales et les cellules immunitaires présentes dans ces amas. Les plaques de Peyer sont des agrégats de follicules lymphoïdes situés entre la muqueuse intestinale et la couche de cellules épithéliales. Ce sont des réservoirs de cellules de l'immunité, des sentinelles. La fonction des cellules M n'est pas entièrement connue mais elles auraient un rôle dans l'immuno-surveillance de l'intestin en présentant des antigènes aux cellules immunitaires des plaques de Peyer, pour déclencher éventuellement une réponse immunitaire (de Lau et al., 2012; Mabbott et al., 2013)(Figure 28).

3. L'épithélium intestinal, une régénération continue

En conditions normales, l'épithélium intestinal est en renouvellement constant, avec une demi-vie de l'ordre de 5 jours. Ce renouvellement se fait sur le modèle du tapis roulant, avec une migration des cellules du bas des cryptes vers le haut des villosités. Schématiquement, les « Crypt Base Columnar Cells », les cellules souches situées à la base des cryptes intestinales et coliques se divisent de façon asymétrique (Cheng et Leblond, 1974). Une des cellules filles entretient le stock de CBC, tandis que l'autre donne une cellule progénitrice qui migre dans le compartiment transitoire d'amplification (TA)(Figure 29). Les cellules progénitrices effectuent 3 ou 4 divisions avant de se différencier et de continuer leur migration vers le haut de la villosité.

Les CBC et les cellules progénitrices formant le TA peuvent être identifiées grâce à un marquage anti- Ki67 (un marqueur de prolifération). La Figure 30 montre une section de duodénum. Le marquage Ki67 (en marron) est cantonné aux cryptes et au compartiment d'amplification. Les cellules de Paneth, également présentes au fond des cryptes (flèches bleues), se distinguent par leur absence de marquage (cellules Ki67⁻), en contraste avec les cellules souches CBC (indiquées par les flèches orange). En se différenciant, les cellules cessent de proliférer. Pour préserver l'intégrité de la barrière immunitaire, un phénomène de desquamation a lieu au sommet de la villosité. Ainsi sont éliminées par apoptose les cellules plus âgées, pour faciliter le renouvellement de l'épithélium. Ce modèle est évidemment schématique car tous les types cellulaires qui composent l'épithélium n'ont pas la même durée de vie : certaines cellules, à fonction immunitaire, ont un temps de demi-vie plus long que les entérocytes.

En condition d'homéostasie, les cellules souches CBC sont les principales responsables du renouvellement de l'épithélium. Pourtant Tian et collègues ont montré que l'ablation spécifique et complète des CBC n'affecte pas l'homéostasie de l'épithélium. (Tian et al., 2012). Dans ce cas, les cellules souches « +4 » sont en attente et interviennent en cas de défaut des cellules CBC, elles sont donc les gardiennes de l'intégrité de l'épithélium (Li et Clevers, 2010). Enfin, une plasticité des cellules intestinales peu différenciées, les progéniteurs, situés dans le compartiment d'amplification, existe. Des études suggèrent que ces cellules auraient la possibilité, en cas de dommage, de régénérer l'épithélium par dédifférenciation (Buczacki et al., 2013; van Es et al., 2012a). Ce compartiment constitue donc une autre réserve de cellules capables de palier à l'absence de cellules souches CBC. En conclusion, le terme de « cellules souches intestinales » (Intestinal Stem Cells) ne recouvre pas un type cellulaire établi mais un ensemble de cellules capables de régénérer l'épithélium intestinal selon les besoins. Les cellules progénitrices et les CBC ont des profils épigénétiques assez proches, ce qui pourrait expliquer leur plasticité en réponse à des stimuli de la niche (Vermeulen et Snippert, 2014).

En parallèle, il existe une compétition entre les différentes cellules souches de chaque crypte pour repeupler la crypte et la villosité. Chaque CBC ayant le même avantage sélectif que la cellule souche voisine, par un phénomène de "dérive neutre" au cours du développement, il y a une dérive clonale de chaque villosité, dont la population est issue d'une cellule souche unique. L'architecture de l'intestin, avec des cryptes compartimentées, pourrait limiter la propagation horizontale d'une crypte à l'autre. Ceci limiterait la progression des tumeurs: si une cellule CBC subit une mutation lui conférant un avantage prolifératif, elle ne colonisera pas tout l'épithélium intestinal (Vermeulen et Snippert, 2014).

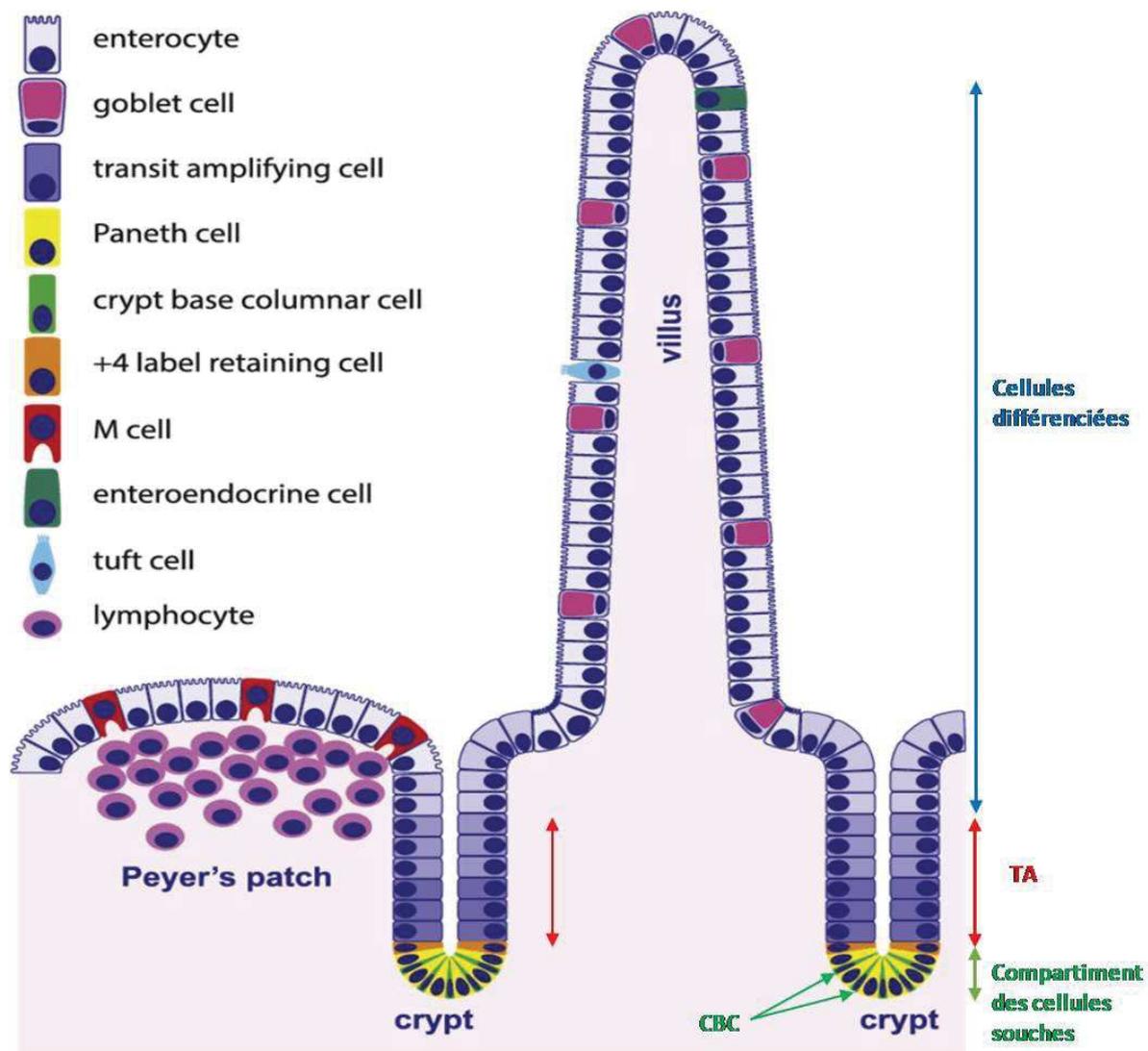


Figure 28: schéma de l'organisation des cellules dans l'épithélium de l'intestin grêle.

Au fond des cryptes se situent les cellules souches CBC (en vert clair) intercalées de cellules de Paneth(en jaune). Les cellules souches +4 sont représentées en orange. En violet foncé ce sont les cellules « progénitrices» qui prolifèrent dans le compartiment d'amplification transitoire avant de se différencier. Les cellules différenciées sont distinguées par différentes couleurs : en rose les cellules caliciformes avec leur vacuole de mucus, en vert les cellules entéroendocrines, les «cellules Tuft» en bleu clair et les entérocytes en violet clair. De plus, sur ce schéma sont représentées en rouge les cellules « M » au niveau d'un plaque de Peyer contenant des lymphocytes. TA : Transient Amplifying compartment. (van Rijn et al., 2016)

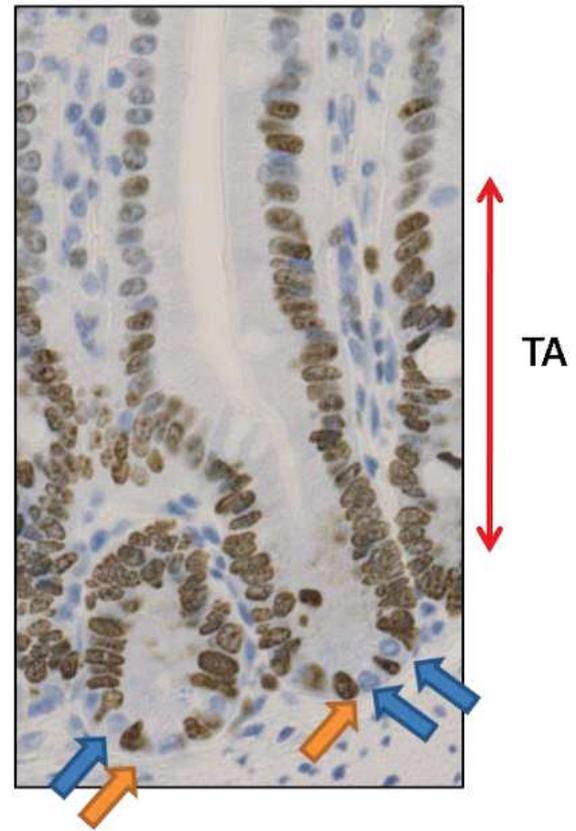
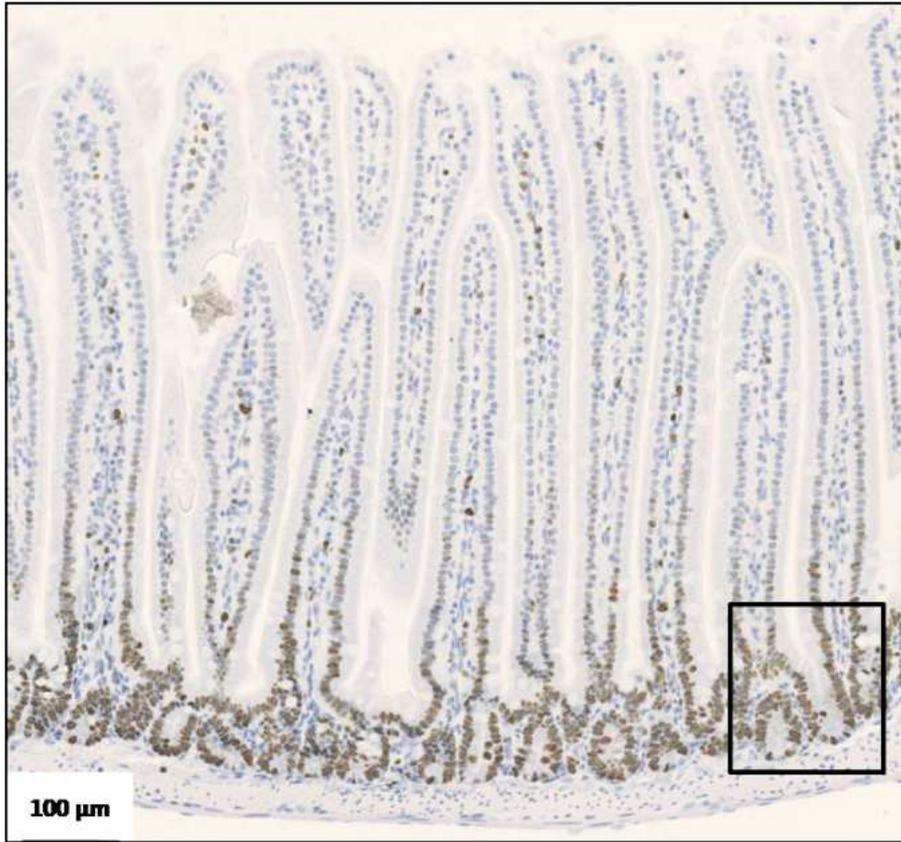


Figure 29: Coupe de duodénum de souris RPAP3+/+

Le marquage avec l'anticorps anti-KI67 permet de mettre en évidence les cellules en prolifération. Ici, le marquage est situé dans le compartiment d'amplification (TA) constitué des cellules progénitrices mais aussi dans le fond des cryptes : ce sont les cellules CBC indiquées par les flèches orange. Les flèches bleues désignent les cellules de Paneth, non marquées car ce sont des cellules post-mitotiques, à l'instar des cellules différenciées des villosités.

4. Les grandes voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le maintien de l'homéostasie intestinale

a) La voie Wnt canonique

La voie Wnt est étudiée depuis longtemps et a été mise en évidence pour la première fois chez la drosophile sous le nom de *Wingless*. Cette voie est très étudiée et possède différentes fonctions essentielles pour le développement embryonnaire ou l'homéostasie des tissus, en régulant la prolifération, la polarité et la différenciation cellulaire (Wodarz et Nusse, 1998). Il y a une forte conservation de la voie Wnt de la drosophile jusqu'au mammifères. En effet, cette voie joue un rôle important, entre autres, dans le développement embryonnaire chez les mammifères (Logan et Nusse, 2004). Sa dérégulation dans l'intestin ou le foie induit la tumorigenèse.

Modèle de signalisation transcriptionnelle par la voie Wnt

(Figure 30)

Dans les cellules intestinales, c'est la voie de signalisation "canonique" qui est à l'œuvre. En absence d'un ligand Wnt, la β -caténine cytoplasmique est séquestrée par le complexe effecteur composé de APC (Adenomatous Polyposis Coli) / Axine / Dishevelled (Dsh) / la kinase GSK-3 β / CK1 α . La phosphorylation de la β -caténine par la kinase GSK3- β a pour conséquence son adressage au protéasome et sa dégradation. Dans ce cas, les gènes cibles de la voie Wnt ne sont pas transcrits, ils sont dans un état dit « OFF ».

En présence d'un ligand Wnt, celui est reconnu par le complexe récepteur LRP/Frizzled qui mobilise l'axine. Dsh vient alors inhiber la kinase GSK3- β . Le complexe effecteur est dissocié, libérant la β -caténine, stabilisée, dans le cytoplasme. Elle migre ensuite dans le noyau où elle forme un complexe avec les facteurs de transcription TCF (T-Cell Factor) et LEF (Lymphoid Enhancer Factor). Ce complexe active la transcription des gènes cibles qui sont alors dans un état « ON ».

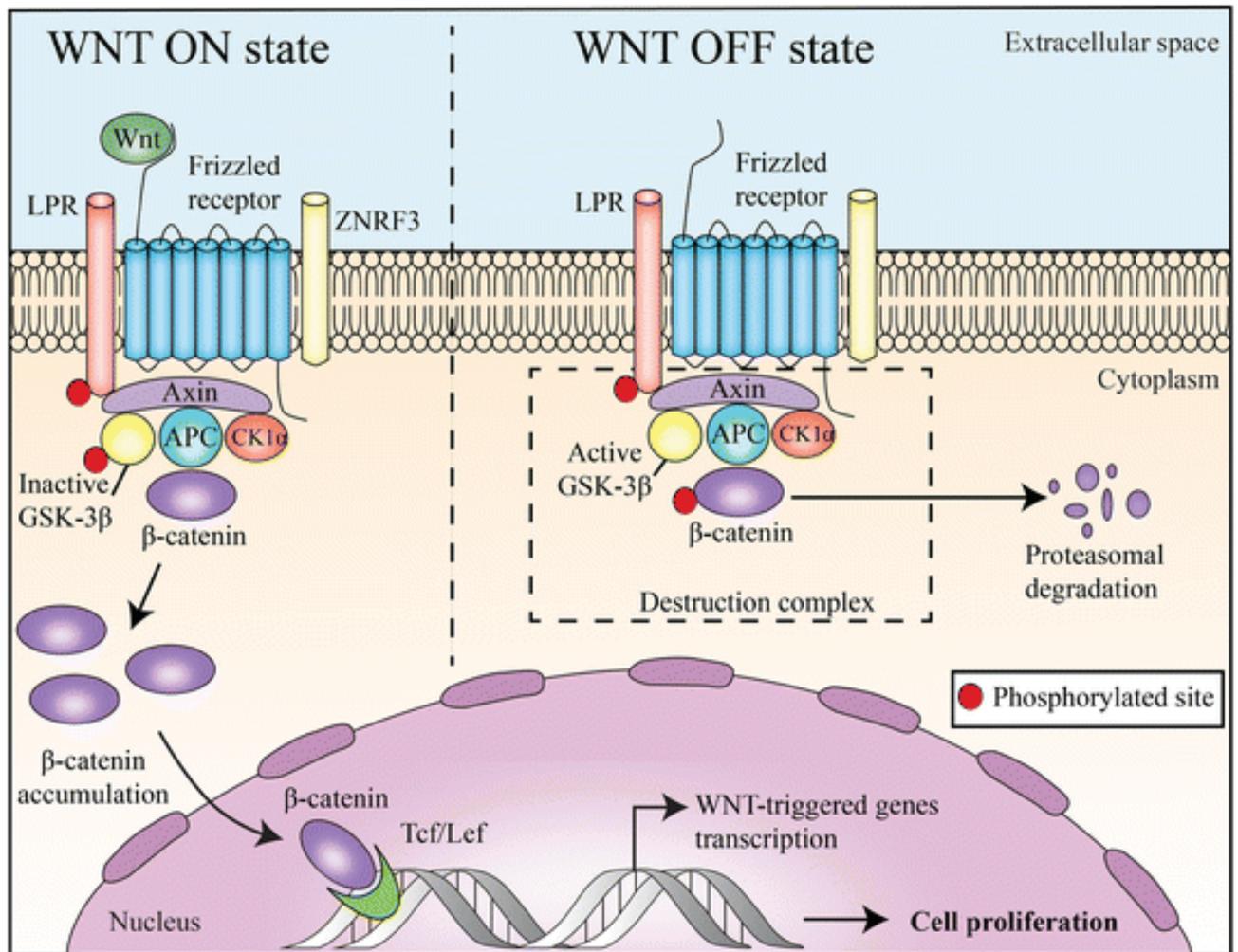


Figure 30 : Schéma descriptif du mode d'action de la voie Wnt canonique.

La fixation du ligand Wnt sur son récepteur (LPR/Frizzled) entraîne l'inactivation par phosphorylation de la kinase GSK-3β et donc du complexe destructeur (GSK-3β -APC-AXIN-CK1α-Dsh (non montré ici)). La β-caténine libre est accumulée dans le cytoplasme et peut ainsi migrer dans le noyau. Elle s'assemble avec des facteurs de transcription tel que TCF / LEF pour activer la transcription des gènes cibles notamment impliqués dans la prolifération (WNT ON state). En absence du ligand Wnt, la β-caténine est séquestrée par le complexe destructeur. Elle est phosphorylée par la GSK-3β. Cette phosphorylation est un signal d'adressage au protéasome pour se dégrader. Les gènes cibles ne sont pas transcrits. (WNT OFF state)

(Pai et al., 2017)

Cas de l'épithélium intestinal :

Sept des 19 ligands Wnt sont exprimés dans l'intestin. Dans le fond des cryptes, on trouve les ligands Wnt3, Wnt 6 et Wnt 9B qui sont connus pour activer la voie canonique de Wnt (Gregorieff et al., 2005). Le ligand Wnt3, sécrété par les cellules de Paneth, active la transcription des gènes des cellules souches en se fixant sur leur complexe récepteur. Un gradient de concentration des ligands Wnt par diffusion est observé, allant des cryptes et diminuant à l'approche des villosités. Cependant leur expression ainsi que celle de leurs récepteurs Fz5/6/7 LRP5/6 est limitée aux cryptes, ce qui limite aussi leur action et explique la localisation des cellules souches dans les cryptes.

Le rôle de la voie Wnt dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal a été montré par différentes approches (Pinto et al., 2003) dont la suppression d'un effecteur TCF4 (voir ci-après) (van Es et al., 2012b; Korinek et al., 1998) et la surexpression d'un inhibiteur de la voie : Dickkopf homologue 1 (DKK1) (Kuhnert et al., 2004). La délétion de la β -caténine dans l'épithélium des souris adultes entraîne un défaut de prolifération dans les cryptes, suivi d'une diminution du nombre de cellules intestinales (Fevr et al., 2007). DKK1 est un antagoniste de la voie Wnt. Sa surexpression dans les cellules épithéliales aboutit à une perte du compartiment d'amplification et des cellules souches, couplé à un défaut de différenciation (Kuhnert et al., 2004).

Chez les mammifères, il existe plusieurs paralogues de TCF. Dans les cellules souches intestinales CBC, seul TCF4 est responsable de la transcription des cibles de la voie Wnt (van Es et al., 2012b). En effet, la déplétion de TCF4 de façon constitutive est létale, car l'épithélium des souris qui naissent ne contient plus que des cellules différenciées. A l'âge adulte, le même knock-out de *TCF4* entraîne une perte du compartiment d'amplification et des CBC des cryptes (van Es et al., 2012b; Korinek et al., 1998) (Figure 31). Au contraire, la délétion des gènes codant pour les autres paralogues de TCF n'a aucun effet: ceci montre une spécialisation des différents TCF, qui ne sont pas redondants (du moins pas dans l'épithélium intestinal).

Dans l'ensemble, toutes ces approches ont montré sans ambiguïté que le maintien d'une voie Wnt active était indispensable au maintien des cellules souches CBC et des progéniteurs du TA. L'abrogation de la voie Wnt conduit à une perte très rapide des CBC et une dégradation de l'épithélium en quelques jours (van Es et al., 2012b; Fevr et al., 2007) entraînant la mort des souris.

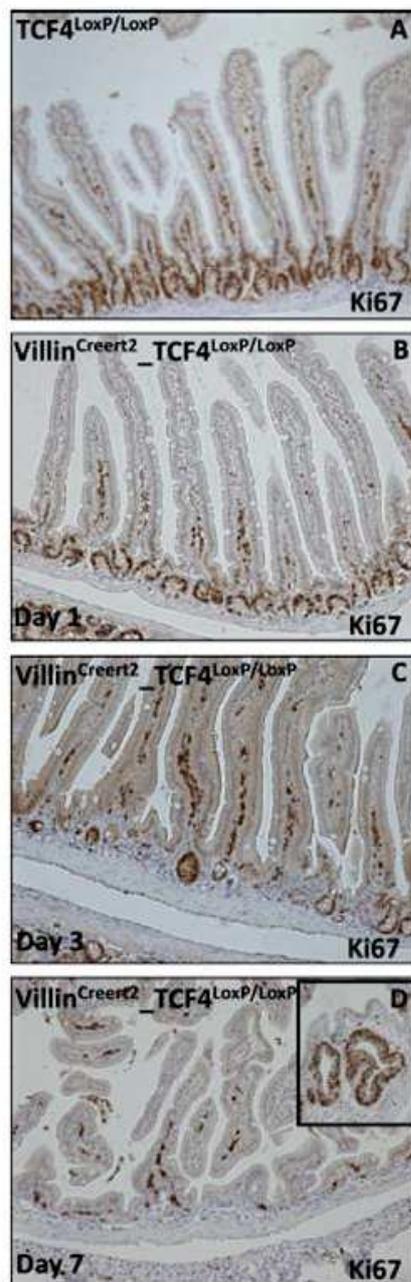


Figure 31 : Invalidation de TCF4 dans l'épithélium intestinal.

Figure issue de (van Es et al., 2012b). Dès 3 jours après l'induction du KO du gène codant pour TCF4 dans les cellules épithéliales (tous types confondus), une diminution drastique du marquage Ki67 est observée suivi d'une perte des cryptes et du compartiment d'amplification.

b) La voie Notch

La voie Notch est conservée de la drosophile, où elle a été initialement décrite, aux mammifères. Elle contrôle la capacité de différenciation des cellules. En effet, la voie Notch a principalement pour fonction de maintenir l'état de progéniteur des cellules souches en assurant une division asymétrique (Bardin et al., 2010; Guo et Ohlstein, 2015; Leedham et al., 2005; Mellott et al., 2017; Rossi et Desplan, 2017; Zhong et al., 1997).

Mode d'action de la voie Notch dans l'épithélium intestinal (Figure 32)

Les ligands des récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires de la famille Delta/Serrate/Lag2 : chez les mammifères les ligands sont Delta 1/2/3 ou Jagged 1, 2. Ces ligands sont reconnus par le récepteur Notch situé à la surface des cellules voisines. Cette voie fonctionne par contact entre cellules. Le récepteur Notch est composé d'un domaine extracellulaire (NECD pour Notch Extra-Cellular Domain/ECN) et d'un domaine intracellulaire (NICD). La liaison du ligand entraîne le clivage de Notch par une protéase ADAM/ TACE (TNF- α ADAM metalloprotease Converting Enzyme) séparant le domaine extracellulaire (NECD) et intracellulaire (NICD) (Figure 33, B). Le NICD est par la suite pris en charge par le complexe de la γ -sécrétase pour subir un second clivage (c). Le domaine NICD migre alors vers le noyau pour former un complexe activateur de la transcription avec les co-activateurs MAM (MAsterMind) et CBP/CSL (CREB binding protein /CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1). Ce complexe active la transcription des gènes cibles. Les gènes cibles sont des gènes de différenciation comme les gènes de la famille *Hes* (Hairy Enhancer of Split) tel que *Hes1*, *Hes5* et *Hes6*, exprimés dans le compartiment prolifératif des cryptes (van Es et al., 2005; Riccio et al., 2008; Schröder et Gossler, 2002) mais aussi un des marqueurs des CBC : *Olfm4*.

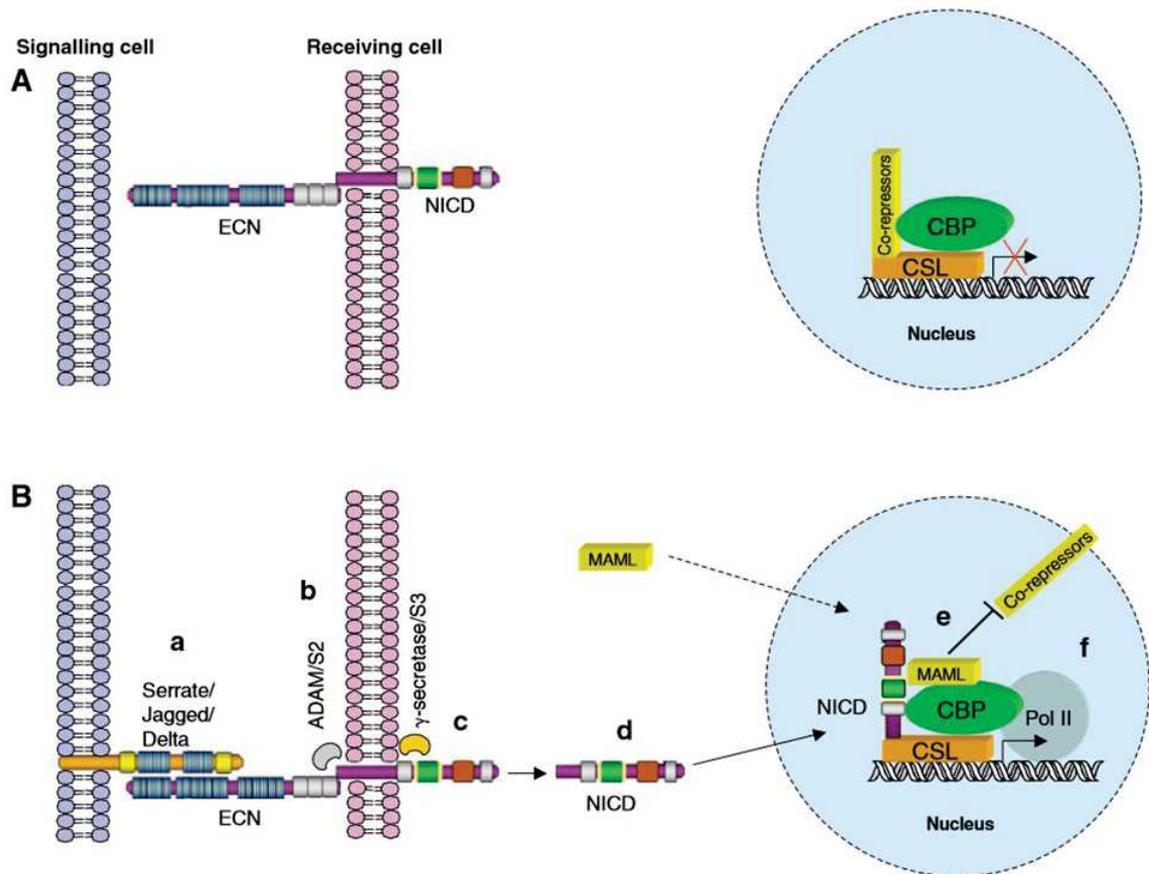


Figure 32 : Représentation simplifiée de la signalisation Notch.

issue de (Hayward et al., 2008)

En absence de ligand, le récepteur Notch reste adressé à la membrane plasmique de la cellule réceptrice. Dans son noyau, les gènes cibles de la voie Notch sont réprimés via l'action de corépresseurs sur le complexe transcriptionnel CSL/CBP.

Si le ligand DSL (Serrate/Jagged/ Delta) est exprimé (a), il est reconnu par la partie externe du récepteur Notch (ECN) (b). Cette liaison active le clivage de la partie externe par une première enzyme (ADAM -S2) puis celui de la partie interne du récepteur (NICD) par la γ -sécrétase (clivage S3). Le NICD est adressé au noyau, où il s'assemble au complexe de la transcription CBP/CSL. Ce complexe active la transcription des gènes cibles par la Polymérase II (Pol II).

Rôle de la voie Notch dans l'épithélium intestinal :

La voie de signalisation Notch est essentielle au renouvellement normal de l'intestin par les cellules souches intestinales. Plus précisément, Notch est impliqué dans la maintenance des cellules en prolifération, il sert à maintenir la balance entre prolifération et différenciation (van der Flier et al., 2009a). L'inhibition de la voie Notch par différents moyens (fixation d'anticorps aux récepteurs Notch1 et Notch2 , inhibition de la γ -sécrétase) provoque une baisse de la prolifération des cellules souches et des cellules progéniteurs (Riccio et al., 2008; Wu et al., 2010). De fait, la transcription d'*Olfm4*, un marqueur des CBC, est directement dépendante de Notch (VanDussen et al., 2012). Dans ces conditions, une augmentation de la différenciation en cellules sécrétrices, notamment en cellules caliciformes, au détriment des cellules absorbantes est observée : il y a une hyperplasie des cellules de Paneth, caliciformes et de Tuft (Tian et al., 2015; VanDussen et al., 2012). La voie Notch assure la différenciation des cellules progénitrices en entérocytes.

En fait, l'équilibre entre prolifération et différenciation en cellules sécrétrices est assuré par une balance entre les voies Wnt et Notch. Notch est nécessaire au maintien d'un niveau d'activité de la voie Wnt favorable aux cellules souches et à la prolifération. Dans le contexte d'une inhibition de la voie Notch, l'inhibition de la voie Wnt (par l'injection d'anticorps dirigés contre le corécepteur des ligands Wnt Fzd/LRP6) restaure un phénotype sauvage de l'épithélium intestinal. L'intégration moléculaire des signaux de la voie Notch et Wnt est encore mal connue. (Tian et al., 2015).

c) **Autres voies de signalisation en jeu dans l'épithélium intestinal**

La voie BMP : Le gradient de diffusion de cette voie est l'opposé de celui de la voie Wnt. La voie BMP est active dans les villosités et s'amointrit dans les cryptes. Cette voie aurait pour fonction de réprimer la voie Wnt dans les villosités pour éviter la prolifération des cellules différenciées. (Batts et al., 2006; He et al., 2004). La surexpression d'un inhibiteur général de la voie BMP (noggin) dès le développement provoque une malformation de l'intestin, caractérisée par la formation de cryptes au niveau des villosités (Crosnier et al., 2006).

La voie de signalisation Hedgehog, elle aussi une voie antagoniste de la voie Wnt, permet de cantonner l'expression de la voie Wnt à la base des cryptes. Les ligands de cette voie sont exprimés dans le haut des cryptes et activent et maintiennent la différenciation cellulaire en entérocytes (van den Brink et al., 2004). L'expression d'inhibiteur de cette voie entraîne un défaut dans l'organisation des cellules épithéliales le long de l'épithélium (Madison et al., 2004).

La voie ephrinB (EphB) est impliquée dans l'organisation des compartiments en assurant le contrôle de la migration cellulaire au sein de l'épithélium. Les ligands (EphB) et les récepteurs sont tous deux des protéines membranaires qui fonctionnent par interaction de contact. L'expression des ligands et récepteurs de cette voie sont soumis au contrôle de la voie Wnt. Par conséquent la voie Wnt régule la migration cellulaire à travers la voie EphB-ephrinB (Kosinski et al., 2007).

5. Le cancer colorectal (CRC)

a) Généralités

Le cancer colorectal représente, tous sexes confondus, le troisième cancer le plus fréquent en France. L'âge moyen du diagnostic est aux alentours de 70 ans mais le cancer survient en général vers l'âge de 50 ans. L'incidence en France en 2020 devrait atteindre 45 000 nouveaux cas contre environ 42 000 en 2012 (site de l'Institut National du Cancer, <http://www.e-cancer.fr>). Il est donc important de trouver des alternatives pour traiter et dépister le cancer colorectal dont le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter.

Médicalement, on considère plusieurs stades d'avancement des cancers colorectaux. Selon le stade, différents protocoles sont appliqués mais le principal traitement reste la résection chirurgicale, accompagnée ou non de traitement chimique ("adjuvant") en amont ou en aval. Ces traitements chimiothérapeutiques utilisent trois types d'agents seuls ou en combinaison: (i) 5-Fluoro-uracil, (ii) Irinotecan: un inhibiteur de la synthèse d'ADN par le blocage de la méthylation de l'uracile, et (iii) oxaliplatine, qui induit la formation de ponts intrabrinés dans l'ADN. Tous ces traitements conduisent à des catastrophes mitotiques et la mort des cellules prolifératives dont les cellules cancéreuses.

L'apparition de métastases est un facteur aggravant. En phase métastatique, l'espérance de vie du patient est d'environ 2 ans. Les métastases sont dues à la dissémination de cellules cancéreuses issues d'une tumeur primaire vers d'autres organes: souvent les poumons, le foie ou le cerveau. Dans les cancers colorectaux, les métastases sont principalement hépatiques.

b) Mécanismes intrinsèques de la tumorigenèse

Sauf dans 5% des cas (la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch), il n'existe pas de prédisposition familiale. La tumorigenèse colorectale est due à des mutations somatiques, avec une activation systématique de la voie Wnt (Muzny et al., 2012). La tumorigenèse est le résultat d'une série d'acquisitions de mutations, dont la séquence a été proposée par B. Vogelstein (Jones et al., 2008). La première étape de la tumorigenèse colorectale semble être une sur-activation de la voie Wnt: une perte de fonction d'*APC* est observée dans plus de 80% des cas, éventuellement accompagnée d'autres mutations dans la voie Wnt. Cette activation de la voie Wnt produit de petits adénomes. D'autres mutations touchant les gènes des voies de signalisation de *KRAS/BRAF* favoriseraient le passage du stade hyperplasie/dysplasie à adénome large mais bénin. Les mutations qui surviendraient par la suite permettraient la progression de l'adénome vers des tumeurs malignes de type carcinome. Ces mutations touchent particulièrement les voies *TGF- β /SMAD4*, *p53* et *PI3K* (Jones et al., 2008)(Figure 33).

On distingue les cancers à instabilité des microsatellites (MSI : Micro Satellite Instability), ainsi que les cancers hyper-mutés ou non hyper-mutés. La séquence des mutations semblent différer dans les tumeurs avec une instabilité des chromosomes (CIN : Chromosome Instability) (qui sont généralement non hypermutées) et les tumeurs avec MSI, généralement hypermutées. Malgré cette grande hétérogénéité, un consensus de catégorisation a été trouvé et définit 4 sous types (CMS : Consensus Molecular Subtype) de cancer colorectal basé sur le niveau d'expression des gènes. Le premier groupe, CMS1, englobe les tumeurs à MSI qui présente une hypermutation dont un enrichissement de la mutation *BRAF*^{V600E} caractérisé et une hyperméthylation. Tout ceci associé à de forts infiltrats immunitaires. Les trois groupes suivant sont associés à des tumeurs présentant des CNI. Le sous-type CMS2 ou sous-type canonique sont des tumeurs épithéliales dans lesquelles : les cibles de la WNT sont surexprimée et celles de MYC sont réprimées. On observe aussi une augmentation de l'expression de certaines cyclines et d'oncogènes: EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) IGF2 (insulin-like growth factor 2), IRS2 (insulin receptor substrate 2) et HNF4A (hepatocyte nuclear factor 4 α). La caractéristique principale du sous-type CMS3 est le changement du programme métabolique ce qui lui vaut le nom de sous-type métabolique. La mutation KRAS, enrichie dans ce groupe, est associée à l'adaptation métabolique des cancers colorectaux. Le dernier sous-type CMS4 ou mésenchymateux est marqué par une activation des voies impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse mais aussi dans le maintien des caractéristiques des cellules souches. De plus, ces tumeurs présentent une surexpression des protéines du modelage de la matrice extracellulaire (MEC) (Dienstmann et al., 2017) (Figure 34). Enfin, certaines cellules du carcinome acquièrent la capacité de migrer et proliférer dans d'autres tissus pour former des métastases : les mécanismes en jeu sont encore controversés. Cette étape semble nécessiter peu de mutations (Jones et al., 2008). Deux modèles s'affrontent : celui de l'acquisition de nouvelles mutations qui favoriseraient la transition épithélio-mésenchymateuse, et celui où les mutations seraient déjà présentes dans les carcinomes et les métastases représenteraient simplement l'étape suivante du processus de carcinogénèse. L'acquisition d'un phénotype de type mésenchymateux (transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT en anglais) permettant aux cellules tumorales d'infiltrer le système circulatoire (intravasation) avait été proposée comme la première étape de la formation métastatique. Cependant cette hypothèse est remise en cause par des expériences récentes sur des modèles murins de cancers métastatiques autres que colorectaux (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015) et ces études semblent favoriser un rôle pour l'EMT dans l'acquisition d'une chimiorésistance par les tumeurs. L'autre modèle propose qu'une sous-population des cellules tumorales ait la capacité de migrer pour initier une métastase (voir d).

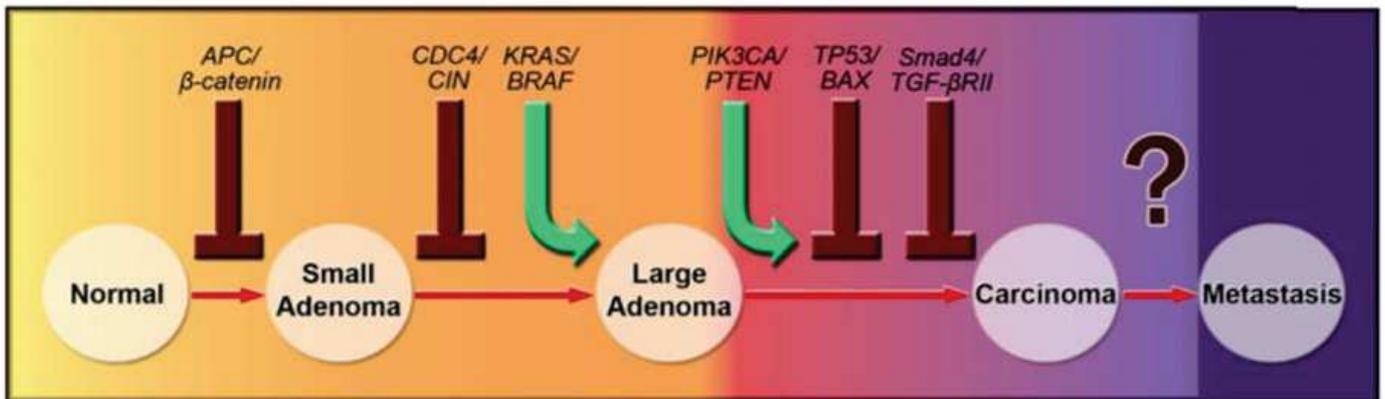


Figure 33 : Séquence des mutations conduisant à la carcinogénèse colorectale
Issue de (Jones et al., 2008)

Ici est représenté un modèle de séquences de mutations qui favoriseraient la progression tumorales. Les mutations de la voie WNT surviendrait au tout début de la chaîne pour initier la tumorigénèse. Ensuite, il y aurait des mutations qui mèneraient à l'inactivation de voies anti-tumorales tel que CDC4 ou une instabilité des chromosomes mais aussi la suractivation des voir KRAS et BRAF. L'intervention de nouvelles mutations pousseraient la tumorigénèse vers la carcinogénèse. L'apparition des métastases n'est pas encore bien élucidée mais l'expression de gènes tels que TGFβ ou de gènes impliqués dans le modelage de la MEC pourrait être en jeux.

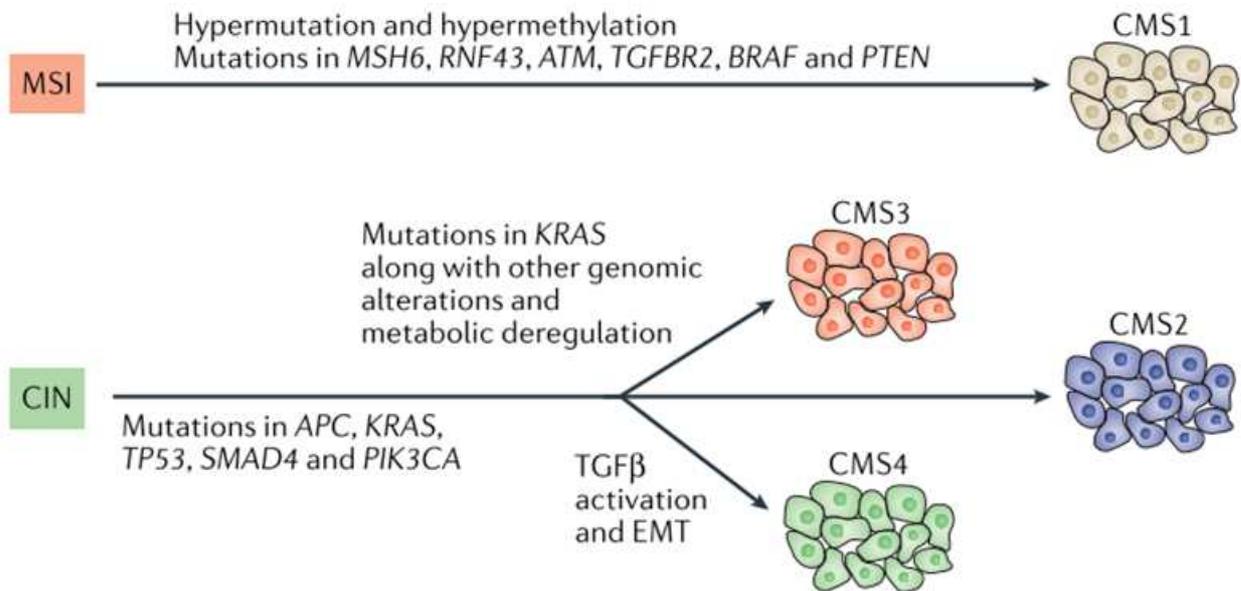


Figure 34 : Classification des sous-types de cancer colorectal

(Dienstmann et al., 2017) On distingue quatre sous-types de cancer colorectal suivant le niveau d'expression de certains gènes mis en cause dans la tumorigenèse. Le CMS1 se distingue par la présence d'instabilité des microsatellites alors que les trois autres présentent une instabilité des chromosomes. L'acquisition de mutation, le profil de méthylation, et les dérégulations métaboliques sont les critères sur lesquels cette classification a été réalisée. Le dogme de la séquence de mutation présentée à la figure 33, semble ne plus être aussi rigide.

Actuellement, il y a deux grandes hypothèses sur l'origine des cancers colorectaux : le modèle « Bottom up » ou hiérarchique et le modèle « Top down » ou stochastique (Figure 35).

Le modèle stochastique suppose que toutes les cellules épithéliales, différenciées ou non, sont susceptibles d'acquérir une série de mutations oncogéniques pour se transformer en cellule tumorale et initier le processus de tumorigenèse colorectale (Krausova et Korinek, 2014; Plaks et al., 2015a; Rizk et Barker, 2012). Dans ce cas, une expansion latérale peut être observée. Des expériences sur des souris ont montré que la réactivation de la voie Wnt dans les cellules épithéliales différenciées peut conduire à la formation de tumeurs lorsque la voie NF- κ B est également activée (Schwitalla et al., 2013). Physiologiquement, la voie NF- κ B est activée en réponse à une agression par un agent pathogène, comme c'est souvent le cas dans l'épithélium intestinal, au contact du milieu extérieur. De fait, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à un risque accru de cancer colorectal (Grivennikov et al., 2010; Middelhoff et al., 2017)

Le modèle «bottom up» ou hiérarchique suppose que les tumeurs auraient comme origine des Cellules Souches Cancéreuses (CSC). Ces cellules souches cancéreuses proviendraient de cellules souches normales ayant accumulé des mutations (Barker, 2014). Ces cellules souches cancéreuses représenteraient une sous-population distincte au sein de la tumeur, capable de se régénérer et d'entrer en quiescence. Les CSC peuvent donner directement différents types de cellules tumorales différenciées ce qui augmente l'hétérogénéité de la tumeur (tumeur polyclonale). Elles peuvent aussi engendrer des cellules de type progéniteurs qui donneront différents lignages cellulaires (tumeur monoclonale). Chacun de ces lignages donneraient lieu à une tumeur composée d'un seul type de cellules tumorales. (Plaks et al., 2015a). Dans ce modèle, les CSC constituent la cible thérapeutique à éradiquer pour traiter efficacement les patients. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs. Dans les faits, la plasticité des cellules épithéliales intestinales est telle que des cellules différenciées peuvent subir une dédifférenciation par la réactivation des gènes des cellules souches (Schwitalla et al., 2013).

c) Hétérogénéité des tumeurs et cellules souches cancéreuses

Les données récentes semblent confirmer, dans les cancers colorectaux, l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein de la population tumorale (Todaro et al., 2014a). Ces CSC se distinguent des autres cellules tumorales par plusieurs caractéristiques, notamment leur:

- quiescence
- auto-régénération
- capacité à initier des tumeurs (d'où parfois la dénomination des CSC en TIC « Tumor Inducing Cells » ou cellules inductrices de tumeurs)
- résistance à l'apoptose.

L'existence des CSC suppose que leur éradication totale est nécessaire pour éliminer toute possibilité de rechute. Cependant, du fait de leur quiescence, ces CSC sont résistantes aux traitements, puisque les thérapies chimiques appliquées aux cancers colorectaux ciblent les cellules prolifératives par induction de dommages à l'ADN. Des études cherchent à identifier des composés chimiques pour pouvoir les cibler spécifiquement (Zizza et al., 2016).

D'autre part, il a été proposé que les CSC seraient à l'origine de métastases, selon l'hypothèse de « la graine et du sol ». Ainsi, la dissémination des CSC et leur éventuelle infiltration conduirait à la formation de métastases lorsqu'elles se retrouveraient dans un microenvironnement favorable.

L'hétérogénéité intra-tumorale est problématique pour les thérapies. Comme nous l'avons vu dans la première partie de l'introduction, HSP90 permettrait l'accumulation de mutations en atténuant les phénotypes qui en découlent et ainsi favoriser leur expansion et leur sélection lors de changements environnementaux. Appliqué au cas du cancer du sein, il a été proposé d'inhiber HSP90 à des doses n'induisant pas la déstabilisation de ses cibles, pour freiner l'apparition et la fixation de mutations dans les cellules tumorales (Queitsch et al., 2002; Rutherford et Lindquist, 1998; Whitesell et al., 2014). Cependant l'impact de ce type de traitement sur les CSC n'a pas encore été analysé.

d) Microbiote et réponse immunitaire

Le régime alimentaire et le mode de vie (consommation d'alcool et de tabac, consommation fréquente de viande rouge et charcuteries, manque d'activité sportive...) ont souvent été incriminés comme facteurs de risque (Chan et Giovannucci, 2010; Dahm et al., 2010). Notre régime alimentaire conditionne l'état de notre microbiote intestinal. Le microbiote est l'ensemble des bactéries commensales présentes dans la lumière de l'intestin. La flore

intestinale varie tout au long du tractus digestif et elle empêche les bactéries potentiellement dangereuses de s'y implanter. Il est donc important de la préserver.

Plusieurs études montrent une différence de la structure de cette flore entre des individus atteints de cancer colorectal et des individus sains. Les premiers à avoir montré cette variabilité sont Moore et Moore (Moore et Moore, 1995). L'influence du microbiote sur les cancers colorectaux s'explique principalement par deux mécanismes :

- les produits sécrétés par les bactéries: ainsi certaines bactéries sous-représentées dans les microbiotes de patients, sécrètent des butyrates. Ces butyrates diminuent le potentiel redox de l'intestin, et par là les conditions favorables à la mutagenèse et la croissance tumorale. Au contraire, d'autres bactéries opportunistes, présentes chez les patients, sécrètent des toxines mutagéniques.
- les réactions immunitaires qu'elles déclenchent.

Le type de réponse immunitaire déclenché par la présence de bactéries dépend du type bactérien (Lasry et al., 2016). La réponse immunitaire peut se révéler anti-tumorale, par exemple lorsque cette réponse implique des lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques (Lévy et al., 2015). Le plus souvent, cependant, une réponse inflammatoire provoque favorise la tumorigenèse, notamment par la sécrétion d'interleukines comme IL-23 et IL-17 ou IL-6 (Grivennikov et al., 2012). Ainsi les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques intestinales (colites ulcéraires, maladie de Crohn) présentent des risques plus élevés de développer des cancers du côlon (Grivennikov et al., 2010; Middelhoff et al., 2017). Chez ces patients, une inflammation chronique provoque une activation prolongée de NF- κ B. NF- κ B peut coopérer avec la voie Wnt pour induire une dédifférenciation des cellules épithéliales en cellules souches cancéreuses (Schwitalla et al., 2013). Surtout, il induit la sécrétion d'IL-6 et de TNF (Tumor Necrosis Factor), deux cytokines pro-tumorales.

e) Rôle des cellules de la niche tumorale

Les cellules tumorales détournent les fonctions du stroma pour créer un microenvironnement qui permette leur maintien et leur expansion : ce processus est indispensable à la tumorigenèse (Scheel et al., 2011). La croissance de la tumeur nécessite notamment un remodelage de la matrice extracellulaire, une néo-angiogenèse pour apporter oxygène et nutriments et la sécrétion de facteurs de croissance comme le HGF (Hepatocytes Growth Factor) et les interleukines pro-tumorales. Les CSC modifieraient ainsi les fibroblastes et les macrophages du stroma pour qu'ils aient une activité pro-tumorale et créeraient un microenvironnement favorable: on parle alors de CAF (CAF : Cancer Associated Fibroblaste) et CAM (CAM : Cancer Associated Macrophages).

Les CAF sécrètent notamment la cytokine CXCL12, un stimulateur de la voie NF- κ B dans les cellules réceptrices, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui favorise la néo-angiogenèse, et l'HGF, un facteur de croissance des cellules tumorales (Plaks et al., 2015b). Ces sécrétions favorisent l'activation de la voie Wnt et Notch pour maintenir les caractéristiques de cellules souches des CSC (Junttila et de Sauvage, 2013; Kalluri et Zeisberg, 2006).

La niche tumorale a également pour but d'échapper à la surveillance immunitaire pour éviter une réponse cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ mais de modifier le comportement des macrophages (CAM) pour qu'ils sécrètent IL-6, TNF α et TGF β (Transforming Growth Factor β). Il-6 soutient la croissance tumorale, le TNF α stimule la voie NF- κ B dans les cellules tumorales et participe ainsi à leur transformation, tandis que TGF β recrute des lymphocytes régulateurs (Treg) pour supprimer la réponse immunitaire (Plaks et al., 2015b). Les CAM participent aussi au remodelage de la matrice extracellulaire.

Le manque de nutriments et d'oxygène (hypoxie) provoque une reprogrammation du métabolisme des cellules tumorales vers le cycle glycolytique. Ce changement métabolique participe à la mise en place d'une hypoxie, qui favorise l'échappement des cellules souches cancéreuses au système immunitaire (Wei et al., 2011). En aidant à cet échappement, l'hypoxie participe à la mise en place de l'EMT (Terry et al., 2017). Elle induit l'expression de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1alpha) qui provoque la sécrétion de VEGF, une cytokine cruciale pour le recrutement de cellules endothéliales et la formation de vaisseaux sanguins (Catalano et al., 2013; Wei et al., 2011). De plus, l'hypoxie protège les cellules cancéreuses des chimiothérapies et des rayons. Cet état d'hypoxie induit une stimulation de l'angiogenèse par les cellules souches cancéreuses mais aussi par les cellules endothéliales. En état d'anaérobiose, les cellules produisent des dérivés réactifs d'oxygène appelé ROS en anglais (Reactive Oxygen Species). Dans la niche intestinale, les ROS proviennent des cellules tumorales qui utilisent la fermentation pour produire de l'ATP, mais des CAF et des CAM qui expriment des enzymes pour maintenir un environnement oxydatif (Catalano et al., 2013). Les ROS sont capables de maintenir les caractéristiques de cellules souches cancéreuses *via* l'activation du TGF- β (Anido et al., 2010; Pavlides et al., 2010). Les cellules tumorales se protègent des ROS par l'expression d'enzymes réductases et notamment, les déterminants de surface des CSC (CD44v6) joueraient un rôle dans la stabilisation de ces enzymes (Catalano et al., 2013; Todaro et al., 2014b).

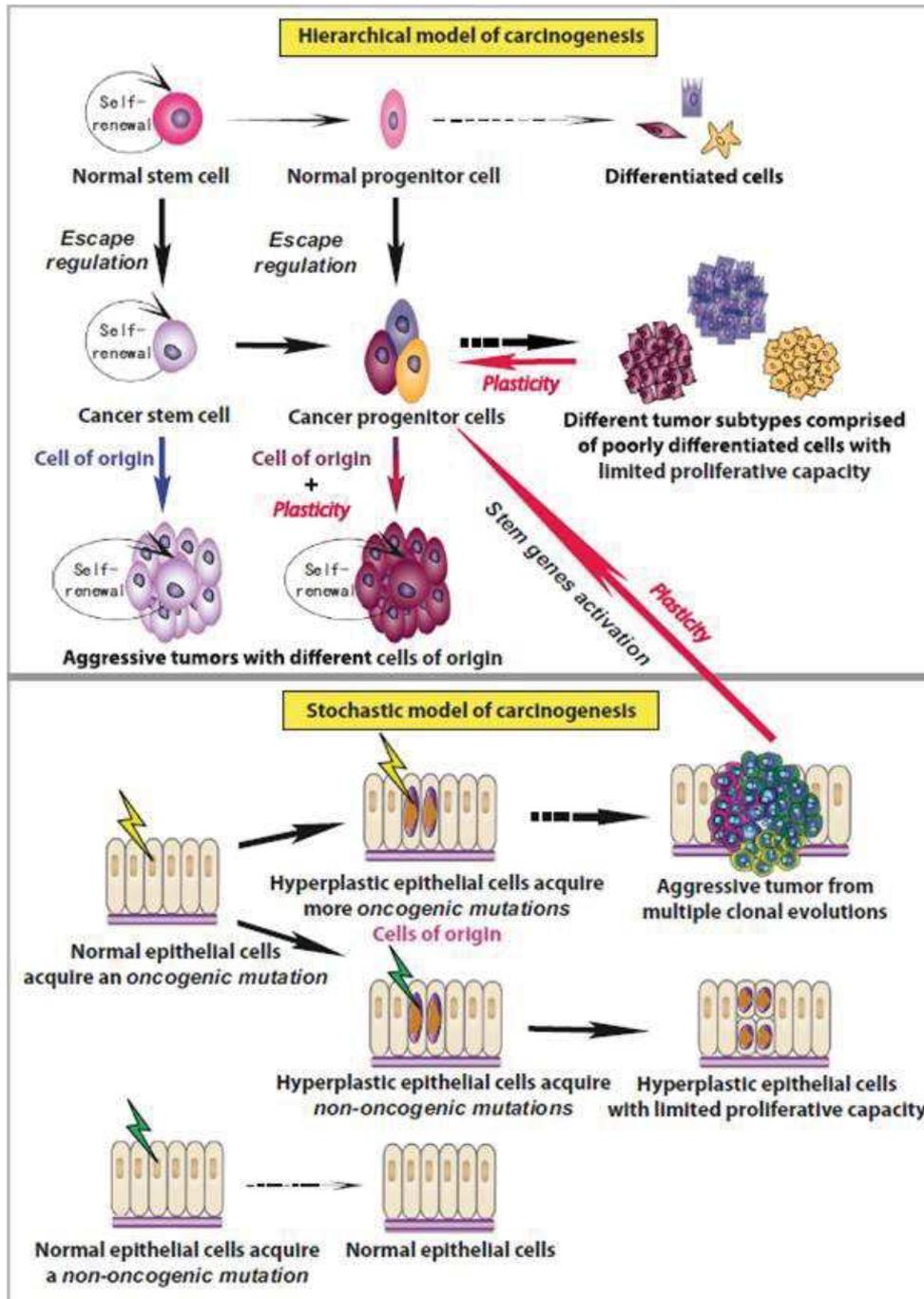


Figure 35 : les 2 grands modèles de tumorigénèse intestinale
 Figure issue de (Plaks et al., 2015a)

f) Modèle murins d'induction de la tumorigénèse colorectale

Dans presque 100% des cas, l'apparition de tumeurs est liée à une sur-activation de la voie Wnt. Le rôle des composants de la voie Wnt a été découvert dans des études de cancers colorectaux héréditaires (FAP pour Familial Adenomatous Polyposis Coli)(Kinzler et al., 1991; Nishisho et al., 1991). La mutation la plus fréquente est celle du gène *Apc* (plus de 80% des cas), entraînant une sur-activation de la voie Wnt. Le complexe APC-Axine-GSK3- β -Dsh ne peut plus se former, la β -caténine est stabilisée et migre dans le noyau. L'augmentation de la β -caténine nucléaire entraîne une hausse de la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. L'un des modèles murin d'étude de la tumorigénèse intestinale est l'inactivation du gène *Apc*, par mutation ou délétion. En 1990, une équipe met en évidence lors d'un traitement avec un mutagène, l'implication du gène *Apc* dans l'apparition spontanée d'adénomes intestinaux et coliques : les souris *Apc^{Min/+}* développent des adénomes intestinaux très tôt au cours du développement (Moser et al., 1990, 1995; Su et al., 1992). D'autres modifications de ce gène ont été proposées pour étudier son rôle ou pour permettre l'étude de tumorigénèse chez l'adulte : notamment des délétions inductibles comme l'allèle *Apc^{flxed}* (Colnot et al., 2004). L'avantage de cet allèle est qu'il est d'une part inductible -contrairement à *Apc^{Min-}* - et d'autre part, il entraîne le développement d'adénomes intestinaux mais aussi colorectaux. Ce phénotype se rapproche de ce qui est observé chez l'homme.

La tumorigénèse est certes initiée par une acquisition de mutations somatiques mais le cancer est aussi une maladie plurifactorielle car l'environnement peut favoriser son apparition. Le protocole d'induction chimique par traitement à l'AOM et au DSS de tumorigénèse colorectale associe ces deux facteurs. La tumorigénèse est induite par l'injection d'un carcinogène Azoxyméthane (AOM) qui entraîne une augmentation des méthylations pro-mutagènes de l'ADN, et favorise l'apparition de mutations. L'inflammation chronique souvent mise en cause chez l'homme est mimée par des cycles d'exposition à un agent inflammatoire, le sulfate de dextran et de sodium (DSS), dilué dans l'eau de boisson (Fazio et al., 2011; Suzuki et al., 2004; Tanaka et al., 2003).

D. Objectifs et déroulement de la thèse

1. Objectif principal : RPAP3 pourrait-il être une cible thérapeutique des cancers colorectaux ?

L'objectif principal de ma thèse était de tester si la protéine RPAP3 pouvait être envisagée comme cible thérapeutique dans les cancers colorectaux. C'est pour répondre à cette question que j'ai reçu un financement de la Ligue Contre le Cancer. Plusieurs données suggéraient que le R2TP pourrait jouer un rôle dans les cancers colorectaux. En particulier, des marquages immuno-histochimiques réalisés sur des coupes de tumeurs de patients par nos collaborateurs, avec un anticorps développé au laboratoire (clone 19B11), montrent que RPAP3 est surexprimé dans 70% des échantillons de tumeurs primaires testés (n=22). Notre hypothèse était qu'une diminution du niveau de RPAP3 ralentirait la croissance des tumeurs. Comme les études sur la drosophile montraient une grande résilience des organes à des baisses d'expression de *Spaghetti*, son homologue *RPAP3* apparaissait comme une cible intéressante dans le traitement des tumeurs.

Un tel objectif est éloigné de l'expertise du laboratoire d'Édouard BERTRAND. Cependant, le site de Montpellier regroupe des équipes spécialisées dans la physiologie de l'intestin et les mécanismes de tumorigenèse colorectale. Ceci est concrétisé par un groupe de travail « SIRIC » sur ce thème, qui a permis de nombreux échanges fructueux. De plus, plusieurs équipes dans l'institut et sur le site avaient développé une expertise dans les modèles murins d'inactivation génétique intestinale – notamment par l'utilisation des recombinaisons Cre sous contrôle du promoteur de la villine - ainsi que dans les techniques d'analyse de l'intestin. Ainsi, nous avons particulièrement profité de l'expertise des équipes de Philippe JAY (IGF) et Michel HAHNE (IGMM).

2. Développement de modèles murins d'inactivation de *RPAP3* et, conduite des expériences sur les souris

Pour tester le rôle de *RPAP3* dans la tumorigenèse colorectale, Bérengère PRADET-BALADE, alors membre de l'équipe d'Édouard BERTRAND, avait initié le développement d'un modèle murin d'inactivation de *RPAP3* (lignée portant l'allèle *RPAP3^{wtsi}* constitutif, codant pour une protéine tronquée). A partir de cette lignée, j'ai généré des souris portant un allèle permettant une inactivation conditionnelle (allèle *RPAP3^{fllox}*).

Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'effet de l'inactivation de *RPAP3* dans l'intestin en conditions physiologiques, car nous en ignorions les conséquences. Contre toute attente, cette inactivation s'est révélée délétère pour les souris. J'ai alors entrepris d'en caractériser les

mécanismes. Puis j'ai mis en place deux modèles de tumorigenèse : un modèle d'induction chimique avec un protocole alliant un carcinogène AOM avec un agent irritant (DSS) (modèle utilisé par l'équipe de Michael HAHNE à l'IGMM) et un modèle génétique d'initiation de la tumorigenèse par l'inactivation d'une copie du gène *APC* (modèle utilisé par l'équipe de Philippe JAY à l'IGF). Ces deux modèles étaient déjà exploités dans l'institut.

Pour toutes ces expériences, j'ai mis en place les protocoles de génotypage des différents allèles : *RPAP3^{wtsi}*, *RPAP3^{fllox}*, *RPAP3^{Δ7}*. J'ai organisé et suivi les croisements des animaux afin d'obtenir les lignées avec lesquelles j'ai travaillé, en utilisant les recombinaisons FlpO, Cre constitutive (Cre) ou inducible (CreER^{T2}), sous contrôle du promoteur de la *Villine* (allèles *VilCre* ou *VilCreER^{T2}*) ou de *Lgr5* (allèle *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}*) mais aussi ceux avec la lignée *APC^{fllox}* pour les expériences de tumorigenèse. Je participe directement à la gestion des différentes lignées que nous avons, en effectuant les génotypages, en triant les animaux et en suivant les accouplements nécessaires. Je définis et j'applique les protocoles de chaque expérience, et, avec l'aide du personnel de l'animalerie ou de l'équipe de Michael HAHNE, je procède aux sacrifices et aux prélèvements.

Mon projet a permis de mettre en évidence l'importance de *RPAP3* dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal dans un modèle *in vivo*. Les futures expériences nous permettront peut-être de montrer son implication dans les cellules souches et ainsi mettre en évidence une nouvelle fonction du R2TP chez la souris. Nos résultats en contexte de tumorigenèse suggèrent que la délétion d'une copie de *RPAP3* a tendance à favoriser la progression et/ou l'initiation des cancers. Notre stratégie de départ était d'enlever *RPAP3* pour ralentir la prolifération, nos données acquises jusqu'à présent nous questionnent sur les mécanismes impactés. Cela nous renvoie à l'utilité de la surexpression de *RPAP3* observée dans les cancers colorectaux, peut-être que *RPAP3* a un rôle protecteur, suppresseur de tumeur.

Notre animalerie a été victime d'une contamination par le virus MHV (Mouse Hepatitis Virus) en février 2015 et il a fallu la fermer, alors que nous venions d'obtenir nos premiers animaux *RPAP3^{fllox/fllox}; Vil-Cre-ER^{T2}*. Nous avons donc procédé à la redérivation de nos lignées. Leur élevage n'a repris qu'en décembre 2015. Durant cette année d'arrêt, j'ai continué à génotyper les animaux pour sélectionner les futurs parents des souris redérivées. La toute première expérience d'inactivation de *RPAP3* par la *VilCreER^{T2}* a eu lieu en mars 2016. Les résultats sur les souris présentés ici ont été obtenus à partir de cette date.

3. Développement d'un sujet connexe : le rôle du domaine C-terminal de RPAP3

J'ai mis à profit l'année d'arrêt de l'élevage pour développer un projet axé sur la compréhension des mécanismes moléculaires du R2TP et la caractérisation de ses interactions. Le but de ce projet était de caractériser la fonction encore inconnue du domaine C-terminal de RPAP3 au sein du R2TP mais aussi chez les protéines porteuses de ce domaine (protéines « RPAP3-like »). Une expérience de protéomique faite par Céline Verheggen avait montré l'association de PIH1D2 avec SPAG1, validant l'hypothèse d'une conservation du mode de fonctionnement du R2TP dans des protéines à domaines « PIH-like et « RPAP3-like ». J'ai participé au développement de ce projet. Nous avons, dans un premier temps, caractérisé les interactions du domaine C-terminal de RPAP3 ainsi que le rôle de RUVBL1 et 2 dans la liaison aux substrats. Puis cette étude, nous a amené à nous questionner sur l'existence de complexes avec une structure similaires au R2TP, que nous nommons les complexes « R2TP-like ».

J'ai cloné les différents domaines de RPAP3 et étudié leurs interactions avec les autres membres par la méthode de double hybride. J'ai réalisé la mutagenèse du domaine C-terminal en me basant sur les données structurales de nos collaborateurs et j'ai testé les différents mutants par double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. J'ai effectué les clonages des plasmides utilisés pour les cribles réalisés par Hybrigenics. J'ai procédé aux expériences d'IP LUMIER pour tester les interactions entre les protéines des « R2TP-like ». Pour les études protéomiques, j'ai mis en place les différentes lignées stables de cellules HeLa et réalisé les IP SILAC. Les structures et les interactions *in vitro* ont été réalisées par nos collaborateurs de l'IMoPA de Nancy et de l'Université de Lisbonne (capables de produire les Rvb1/2 *in vitro*).

Mon travail a permis de mettre en évidence la fonction jusqu'alors inconnue du domaine C-terminal de RPAP3 mais aussi de caractériser la structure du R2TP humain. Ces données apportent une meilleure compréhension des interactions au sein de complexe R2TP humain. Grâce à ce projet, nous pouvons proposer un modèle d'assemblage des substrats du R2TP plus complet. De plus, ce projet nous a permis de mettre en évidence un complexe apparenté au R2TP de par sa structure mais aussi sa fonction. Il soulève donc la question de l'existence d'autres complexes du même type et leur fonction dans l'organisme et les ciliopathies.

II. Résultats

A. Rôle de RPAP3 dans l'épithélium intestinal et la tumorigénèse

1. Introduction

Historiquement, l'équipe s'intéresse à l'assemblage des petites particules ribonucléiques nucléolaires (en anglais snoRNP). Ces snoRNP sont nécessaires à la production des ribosomes, eux-mêmes responsables de la synthèse des protéines. Ces études nous ont permis de caractériser le complexe R2TP. Il est composé de quatre protéines : RPAP3, qui relie le R2TP à HSP90; PIH1D1, qui interagit avec RPAP3 et recrute les protéines clientes; et RUVBL1/RUVBL2, deux AAA+ ATPases dont la fonction moléculaire est encore inconnue. Le R2TP est très conservé de la levure *S. cerevisiae* à l'homme (Zhao et al., 2008; Zhao et Houry, 2005). Chez les mammifères, on le trouve associé à une série de préfoldines pour former ce qu'on appelle le R2TP/Prefoldin-like complexe (Boulon et al., 2008). Ce complexe recrute le chaperon moléculaire HSP90 (Heat Shock Protein 90) et stabilise puis assemble plusieurs machineries de base de la cellule, comme les ARN polymérase (Boulon et al., 2010), plusieurs RNP non-codantes dont les snoRNP (Bizarro et al., 2014, 2015; Malinová et al., 2017), et les kinases de la famille des PIKKs qui comprennent mTOR, TRRAP, ATR, ATM et DNA-PKcs (Hořejší et al., 2010; Takai et al., 2007; Takai et al., 2010). Toutes ces machineries sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule car impliquées dans les réparations des dommages de l'ADN, la biogenèse des ribosomes ou encore la transcription (Boulon, et al., 2012)(Figure 1.A).

Les complexes assemblés par le système HSP90/R2TP sont nécessaires à la prolifération, ce qui fait du R2TP un bon candidat à étudier dans le cadre de l'épithélium intestinal, un organe en régénération continue. En effet, cette régénération continue suppose un contrôle de la synthèse protéique (rôle des ARN polymérase, des snRNP, des snoRNP et de mTOR), du cycle cellulaire (rôle de TRRAP dans SAGA), mais aussi une réponse des dommages à l'ADN qui peuvent apparaître au cours de la réplication (rôle d'ATR, ATM et DNA-PKcs) pour ne pas propager de mutation. Si une mutation apparaît dans une cellule souche, elle sera transmise à toutes ses cellules-filles, ce qui pourrait conduire à des aberrations et à des processus de transformation cellulaire. Le R2TP pourrait être un des gardiens de cette intégrité, en contrôlant simultanément ces aspects.

Plusieurs données suggèrent un lien entre HSP90/R2TP et la tumorigénèse. Tout d'abord, HSP90 est une cible dans le cadre du cancer, et des drogues la ciblant sont en cours de test cliniques pour plusieurs types de tumeurs solides tels que les tumeurs rénales, du sein, de la prostate ou encore pancréatiques (Neckers et Workman, 2012). Ensuite, les AAA+ ATPases

RUVBL1/2 sont surexprimées dans les cancers hépatiques et colorectaux, et sont nécessaires à la tumorigenèse hépatique (Haurie et al., 2009; Huber et al., 2008). L'étiologie des cancers hépatocellulaires, comme celle des cancers colorectaux, a pour origine une sur-activation de la voie Wnt.

Pour tester si ce rôle des RUVBL1/2 impliquait le R2TP, nous avons établi des collaborations avec des cliniciens. Grâce à un anticorps monoclonal développé au laboratoire, nous avons vérifié que RPAP3 est surexprimé dans les cancers hépatocellulaires et colorectaux (données non publiées, obtenues en collaboration avec l'équipe de J. Rosenbaum à Bordeaux et avec l'équipe de N. Rossano à Pescara, Italie). Ces données sont cohérentes avec les données de transcriptomique établies à partir de tumeurs de patients ainsi que les résultats d'immunohistologie disponibles sur le site « Bio-Atlas ». L'ensemble de ces résultats nous a fait postuler que le R2TP – et plus précisément RPAP3- pouvaient être une cible thérapeutique dans les cancers hépatocellulaires ou colorectaux (Boulon et al., 2012).

Nous avons donc choisi d'étudier le rôle de *RPAP3*, comme élément constitutif du R2TP, dans des modèles murins. Nous avons choisi de concentrer nos études sur l'intestin, au cours de la tumorigenèse mais aussi en conditions physiologiques. De plus, le site de Montpellier concentre des équipes spécialisées sur ces thématiques et un SIRIC dédié au cancer colorectal. Nous avons choisi de cibler *RPAP3* car :

(1) il sert de lien entre la protéine chaperonne HSP90 (*via* ses domaines TPR) et ses partenaires du R2TP : PIH1D1 et RUVBL1/2 ;

(2) sa délétion est viable chez la levure *S. cerevisiae* (tandis que la délétion de Pih1 affecte plus fortement la croissance des levures), et son knock-down affecte peu la croissance des organes de *Drosophila*. L'ensemble de ces données suggérait donc que RPAP3 pouvait avoir un rôle de chaperon en conditions de stress cellulaire (compétition cellulaires pour les ressources nutritionnelles, changement morphogénétiques...). Ces caractéristiques en font un bon candidat pour cibler les cellules tumorales.

2. Résultats

Mon travail a contribué à l'élaboration de l'ensemble des figures de ce projet. Les coupes et les marquages standard (HE, PAS, Ki67) sont effectués par la plateforme locale RHEM, les autres par et avec François GERBE, de l'équipe de Philippe JAY à l'IGF (Montpellier). J'ai ensuite analysé les données avec Bérengère PRADET-BALADE.

a) Rôle de RPAP3 dans la physiologie intestinale

- **RPAP3 est essentiel au développement embryonnaire chez la souris.**

Grâce à des cellules ES recombinantes générées par le consortium *KOMP*, nous avons généré des animaux portant différents allèles de *RPAP3*: un allèle hypomorphe *RPAP3^{wtsi}*, qui code pour une protéine tronquée, et un allèle conditionnel *RPAP3^{lox}*, où l'exon 7 de *RPAP3* est flanqué de deux sites LoxP (Figure 2A).

A partir de l'allèle *RPAP3^{lox}* on obtient l'allèle invalidé *RPAP3^{Δ7}* par recombinaison avec une Cre qui reconnaît les sites LoxP. Nous avons effectué des croisements afin d'obtenir des souris homozygotes pour l'allèle hypomorphe (*RPAP3^{wtsi}*) sans succès (nombre obtenu/attendu = 0/12), ce qui suggère que RPAP3 est nécessaire au développement embryonnaire chez la souris (Figure 2C).

- **RPAP3 est exprimé de façon ubiquitaire chez la souris**

J'ai procédé dans un premier temps, à l'analyse par Western Blot de l'expression de RPAP3 chez la souris. Après avoir extrait les protéines de différents tissus, j'ai pu montrer que RPAP3 est exprimé au niveau protéique dans tous les tissus adultes testés (données non montrées). Nous nous sommes demandé dans quels types cellulaires de l'épithélium intestinal RPAP3 était localisé.

- **Mise en évidence de RPAP3 dans les cellules en prolifération de l'intestin**

Grâce une technique d'immuno-histochimie, j'ai montré que RPAP3 était exprimé dans l'épithélium intestinal, particulièrement dans le compartiment d'amplification ainsi que dans les cellules souches. Les cellules de Paneth, l'autre catégorie de cellules composant la crypte, n'expriment pas *RPAP3* (Figure 1B). L'expression de *RPAP3* est cantonnée aux cellules en prolifération car nous constatons une superposition des signaux des anticorps anti-RPAP3 et anti-Ki67, un marqueur de prolifération. RPAP3, et le R2TP, pourraient avoir une fonction dans le contrôle de la prolifération au sien de l'épithélium intestinal. Afin de tester cette hypothèse, nous avons généré des modèles murins d'invalidation de RPAP3 spécifiquement dans l'épithélium intestinal et colique.

- **La délétion de *RPAP3* entraîne une dégradation rapide de l'épithélium intestinal**

Nous avons rencontré le même problème de létalité quand nous avons voulu utiliser l'allèle floxé pour *RPAP3* avec la Cre sous contrôle du promoteur de la Villine, exprimée dans l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (souris *VilCre ; RPAP3^{flox/flox}*) (El Marjou et al., 2004). L'inactivation constitutive de *RPAP3* est létale (nombre obtenu/attendu = 0/16) (Figure 2C). Cela concorde avec nos données chez *D. melanogaster* où *Spaghetti* est nécessaire au développement.

Afin de palier à cette mortalité, nous avons créé une lignée où l'inactivation de *RPAP3* peut être induite à l'âge adulte dans l'intestin, grâce à l'utilisation d'une Cre inducible par le tamoxifène (*VilCreER^{T2}*). Chez ces animaux et leurs contrôles, nous avons appliqué un protocole établi dans l'animalerie du laboratoire, qui consiste en deux injections successives de 2mg d'une solution de tamoxifène à une journée d'intervalle (Jour 0 et Jour 1). Les PCR sur l'ADN génomique des cellules épithéliales de l'intestin montrent une recombinaison génique détectable dès le 1^{er} jour après la première injection de tamoxifène. Cette recombinaison est maintenue pendant au moins 4 jours, ce qui suppose que la recombinaison a bien eu lieu dans les cellules souches qui peuvent ensuite transmettre cette recombinaison à leurs cellules filles (Figure S2).

Nous avons procédé à l'inactivation de *RPAP3* dans l'intestin et le côlon dans des souris âgées d'au moins 6 semaines, âge où le tractus digestif est considéré comme mature. J'ai observé un phénotype sévère dès 6 jours post-induction dans les souris d'intérêt *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/flox}* avec une perte de poids proche de 20% du poids initial et des signes de souffrance. J'ai ainsi dû sacrifier la plupart des animaux à 8 ou 10 jours. Certains individus plus résistants (parce que plus corpulents au début de l'expérimentation) ont pu être analysés 17 jours après la première injection de tamoxifène. (Figure 3B et Sup. 3)

Le phénotype est caractérisé par :

- une perte de plus de 20% du poids initial des animaux,
- une distension de l'intestin grêle par l'accumulation de liquide,
- l'effacement de l'axe crypto-villositaire,
- la disparition de la couche épithéliale,
- un raccourcissement de la longueur de l'intestin grêle d'environ 50%.

Sur les images à jour 8, les cryptes ainsi que le compartiment d'amplification ont presque totalement disparu. Seules des cryptes résiduelles, positives au KI67 - donc vraisemblablement prolifératives - semblent persister (Figure Sup. 4). Cette destruction expliquerait le gonflement de l'intestin (Figure Sup. 3) : les échanges avec la lumière de l'intestin ne peuvent plus se faire, ni

l'eau ni les nutriments ne sont absorbés. Il en découle la forte perte de poids visible à partir du jour 6.

- **Un phénotype différent entre l'intestin et le côlon ?**

L'invalidation de *RPAP3* affecte plus sévèrement l'intestin grêle que le gros intestin : après 10 jours de traitement, l'épithélium colique semble globalement préservé alors que celui de l'intestin grêle est détruit. Il semblerait que les souris ayant réussi à passer le point critique de 10 jours reprennent alors du poids.(Figure Sup. 3A). L'épithélium intestinal de ces souris survivantes a été observé 17 jours après l'invalidation.

Le phénotype se caractérise par deux choses :

- (1) l'épithélium de l'intestin grêle présente des villosités et des cryptes irrégulières, avec des villosités polylobées et hyperplasiques (Figure 3 B) qui semblent fonctionnelles,
- (2) l'épithélium colique est affecté : une perte de cryptes est observée et une morphologie également irrégulière (Figure Sup 3D).

Il est possible que l'épithélium intestinal se soit régénéré à partir des cryptes résiduelles observées à jour 10. Des marquages du Ki67 et *RPAP3* sont prévus pour déterminer si cette régénération est due à des cryptes qui auraient échappé à la recombinaison et seraient donc *RPAP3*^{+/+}("escapers"), ou si une autre voie supplée au manque de *RPAP3* (« by-passers »).

Chez les souris ayant réussi à passer le point limite, on observe une distorsion de l'architecture de l'épithélium colique. La cinétique semble différente entre ces deux parties du tractus digestif. L'invalidation de *RPAP3* affecte donc l'intestin grêles et le côlon mais avec une latence par rapport à l'intestin grêle.

- ***RPAP3* est essentiel au maintien des cryptes et du compartiment d'amplification**

J'ai procédé à une cinétique afin de déterminer la séquence des évènements qui induisent la dégradation de l'épithélium. Six jours après le début du traitement, la morphologie et le marquage Ki67 (un indicateur de prolifération) sont identiques à ceux des contrôles. Nous constatons la perte totale du signal Ki67 dans le compartiment d'amplification et les cryptes dès 7 jours, dans un épithélium globalement intact. Brusquement après 8 jours, il y a une perte quasi-totale du marquage Ki67 et l'épithélium est très dégradé (Figure 4B). Nous constatons également la présence de cryptes prolifératives, circulaires, Ki67⁺ et potentiellement hyperplasiques (Figure 4B et Figure Sup. 4B). Les villosités sont affectées, leur morphologie et intégrité s'estompent.

L'intestin est en renouvellement continu, les cellules différenciées migrent vers le haut des villosités où elles meurent par apoptose. Dans les souris *VilCreER^{T2};RPAP3^{fllox/fllox}*, la migration de ces cellules se poursuit, mais ces cellules ne seraient pas remplacées car les CBC ainsi que les

progéniteurs meurent ou cessent de proliférer (nous n'avons pas détecté de signal pour la caspase 3, indicatif d'une apoptose des cellules). Les mécanismes de régénération de l'épithélium semblent bloqués. *RPAP3* agit donc sur le maintien de la prolifération dans les cryptes intestinales et le compartiment d'amplification transitoire.

Après un marquage PAS qui met en évidence les cellules caliciformes (responsables de la production de mucus) je n'observe pas de variation quantitative ni de délocalisation de ces cellules le long de l'axe crypto-villositaire (ainsi que cela a été décrit pour l'inactivation de *mTOR*, par exemple (Zhou et al., 2015)). Ceci suggère que les CBC et progéniteurs cessent de proliférer, sans différenciation massive (Figure 4 et 4 supplémentaire). Par coloration HE et marquage des lysozymes, je n'observe pas non plus de disparition des cellules de Paneth (Figure 4.B et 5). Ceci est concordant avec le fait qu'elles n'expriment pas *RPAP3* et que ce sont des cellules qui se divisent rarement (elles sont KI67 négatives). Les cellules de Paneth étant intactes, on peut supposer qu'elles sécrètent toujours le ligand Wnt3 nécessaire au maintien des cellules souches. Dans ce cas, les CBC semblent y être insensibles car les cryptes disparaissent. La question que nous posons ici est donc le rôle de *RPAP3* dans le maintien des CBC.

- ***RPAP3*, un facteur essentiel au maintien des cellules souches de type CBC ?**

Pour vérifier cela, nous allons réaliser des immuno-marquages avec un anticorps anti-OLFM4, un marqueur spécifique des cellules CBC. Grâce à cette expérience, nous pourrions voir si la délétion de *RPAP3* impacte la survie des cellules souches CBC. En parallèle, j'ai également construit une lignée murine où je peux invalider, de façon inductible, *RPAP3* uniquement dans les cellules CBC. Pour ce faire, j'ai utilisé une lignée "Knock in" où la construction polycistronique "*GFP – IRES -CreERT2*" a été introduite en fusion avec la séquence de *Lgr5*: dans ces souris, les cellules CBC *Lgr5*⁺ expriment donc la GFP ainsi que la Cre inductible (Barker et al., 2007). Cependant, cette Cre est peu pénétrante, dû à son expression mosaïque.

L'inactivation de *RPAP3* dans les souris *Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2*; *RPAP3*^{fl_{ox}/fl_{ox}} ne conduit pas à une altération globale de l'épithélium intestinal, même après 11 jours. Je vais procéder à un marquage GFP pour voir si dans les souris *Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2*; *RPAP3*^{fl_{ox}/fl_{ox}}, le nombre de cryptes avec des cellules GFP⁺ est modifié par rapport aux contrôles *Lgr5 GFP-CreERT2*; *RPAP3*^{+/+}.

b) RPAP3 et la tumorigenèse

RPAP3 est nécessaire au maintien de la prolifération. Notre hypothèse est que si *RPAP3* est surexprimé dans les tumeurs colorectales, peut-être que son rôle est de soutenir la prolifération et la croissance tumorale, comme il le fait pour le *TA* et les cellules souches. Du fait de la létalité engendrée par la délétion homozygote de *RPAP3*, nous avons pris le parti d'utiliser des souris hétérozygotes. L'inactivation d'une copie du gène *RPAP3* en contexte de tumorigenèse pourrait être un moyen de mimer l'action de drogues, qui diminuent l'activité de leur cible sans l'abolir complètement. Pour l'étude du rôle de *RPAP3* dans la tumorigenèse, j'ai utilisé deux modèles différents :

- 1) un modèle génétique où l'inactivation d'une copie du gène *APC* induit des tumeurs intestinales et coliques,
- 2) un modèle chimique « AOM/DSS » qui reproduit les différentes étapes de carcinogénèse colorectale chez l'homme. Ce dernier engendre des adénomes exclusivement dans le côlon.

• Résultats préliminaires de la délétion de *RPAP3* dans le modèle d'induction génétique

Nous avons utilisé un modèle pour invalider simultanément une copie de *RPAP3* et *APC* dans l'épithélium intestinal quand les animaux atteignent 8 semaines. La délétion de l'exon 14 d'un allèle *APC* permet son inactivation, et cela est suffisant pour favoriser l'apparition d'adénomes par dérégulation de la voie Wnt (Colnot et al., 2004). Les animaux d'intérêt *VilCreER^{T2}; RPAP3^{fllox/+}; APC^{fllox/+}* sont comparés à des contrôles *VilCreER^{T2}; RPAP3^{+/+}; APC^{fllox/+}*. Les animaux subissent le même protocole que pour les expériences sur l'homéostasie (2 injections consécutives de 2mg de tamoxifène). Pour l'analyse des tissus, nous regardons 12 semaines après l'induction.

Nos premiers résultats révèlent de grandes disparités au sein de chaque cohorte (variations interindividuelles), ainsi que d'une expérience à l'autre, ce qui complique l'analyse. Les croisements mis en place nous ont donné plus d'animaux d'intérêt que d'animaux contrôles, nous avons donc relancé de nouveaux croisements pour comparer l'effet d'une délétion de *RPAP3* dans des fratries. Cependant quelques différences entre les génotypes apparaissent. La perte d'un allèle de *RPAP3* semble favoriser l'apparition d'adénomes chez la souris. Nous avons choisi dans un premier temps de diviser nos observations en 3 groupes :

- quand la dysplasie est inférieure à 1% de la surface totale de la section (cas 1),
- quand elle est comprise entre 1 et 5 % (cas 2),
- quand elle est supérieure à 5% (cas 3).

La première observation est que ces dysplasies les plus importantes (>5%) sont observées uniquement dans le côlon, et présentent une perte totale de la structure épithéliale (caractérisée notamment par une absence de cellules caliciformes) suggérant une différenciation carcinogène. Nous avons constaté plus de petites dysplasies chez les animaux ne comportant qu'une copie de *RPAP3* mais, proportionnellement, moins d'adénomes de taille moyenne correspondant au cas n°2 sur la Figure 6 du manuscrit. Ces premières expériences semblent indiquer que *RPAP3* jouerait freinerait l'apparition des tumeurs, mais soutiendrait leur croissance : la délétion d'une copie de *RPAP3* semblerait ralentir la propagation des petits adénomes en adénomes de taille moyenne.

Dans le côlon, on observe peu d'adénomes : il semblerait que dans ce tissu les lésions progressent presque systématiquement en carcinomes. La faible fréquence de cet événement nécessite que nous collections des données sur de plus grandes cohortes pour pouvoir les interpréter.

- **Rôle de *RPAP3* dans la tumorigenèse colique induite par traitement chimique**

En parallèle, j'ai utilisé un protocole d'induction chimique AOM/DSS bien établi et utilisé par nos collaborateurs (Rocha et al., 2014). Nous avons utilisé un groupe contrôle, *vil-Cre-ERT2; RPAP3 +/+* ; et un groupe d'intérêt, *vil-Cre-ERT2; RPAP3^{lox/+}*. Comme pour les expériences précédentes, les animaux sont âgés d'au moins 8 semaines lors de l'inactivation au tamoxifène. Une semaine après l'inactivation, nous débutons le protocole d'AOM/DSS (voir introduction). Les tissus sont prélevés 65 jours après le début du protocole. Les analyses sont en cours, mais nos données préliminaires semblent rejoindre celles des expériences avec le modèle génétique précédent. Avec ce protocole, tous les animaux présentent un épithélium colique altéré par de l'hyperplasie, de la dysplasie, de la perte de cryptes et des infiltrats immunitaires. Dans un premier temps, j'ai analysé quantifié ces paramètres dans une expérience (n=7 pour chaque groupe, lors de cette expérience). Dans cette expérience, les différences entre les groupes sont faibles mais il apparaît que le groupe ne comportant qu'une seule copie de *RPAP3* présenterait plus de dysplasie (Figure 7). Nous allons reprendre ces analyses avec l'aide d'anatomo-pathologistes pour caractériser précisément les différents types de lésion observés.

"Invalidation of RPAP3 in mouse intestine reveal an crucial role for R2TP in homeostasis of the intestinal epithelium"

authors: Chloé Maurizy

F. Gerbe, D. Helmlinger, P. Jay, C. Paul, E. Bertrand, M. Hahne (order to be determined)

Bérengère Pradet-Balade

key words: RPAP3, R2TP, HSP90, CBC, intestine

Abstract:

HSP90 is a chaperone with many substrates, targeted *via* different adaptors called "co-chaperones". Recent discovery of R2TP, an HSP90 cochaperone, allowed the identification of new HSP90 substrates, which include: snoRNPs, telomerase RNP, the nuclear RNA polymerases and PIKKs. All these substrates play key functions in cellular proliferation and tumorigenesis. R2TP is formed of four proteins: RUVBL1, RUVBL2, PIH1D1 and RPAP3, some of which are overexpressed in hepatocellular and colorectal cancer. To address the role of R2TP in colon homeostasis and tumorigenesis, we generated a conditional knockout murine model for *RPAP3*. The invalidation of *RPAP3* in adult intestine, using an inducible recombinase (*vilCreER^{T2}; RPAP3^{fl/fl}*), leads to a drastic destruction of the epithelium 8 days post-induction, resulting in death after 10 days. We observe a proliferative defect in Crypt Base Columnar stem cells (CBC cells) and in the Transient Amplifying compartment, while Paneth cells are not affected. This phenotype is very similar to that described for the Wnt pathway, which is crucial for intestinal stem cell maintenance. We are now testing the role of R2TP on the Wnt pathway. In parallel, we address the possibility of a therapeutic window to target *RPAP3* during intestinal tumorigenesis. For this, we use heterozygous animals (*vilCreER^{T2}; RPAP3^{fl/+}*) in which tumorigenesis is induced either (i) by a chemical treatment, taking advantage of the well-established AOM/DSS protocol, or (ii) by a genetic model, removing a copy of APC (*vilCreER^{T2}; RPAP3^{fl/+}; APC^{fl/+}*). These ongoing experiments will address the role of R2TP in intestinal CBC and its relevance in tumorigenesis.

Acknowledgements:

people and facilities: RAM, RHEM,

fundings: la Ligue Nationale Contre le Cancer (EB, CM), INCA (EB, MH, BPB)

materials/strains: S. Robine (VCT), S. Colnot (APC), Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}

"Invalidation of RPAP3 in mouse intestine reveal an unexpected role for R2TP in homeostasis of the intestinal epithelium"

Introduction:

The R2TP complex was first discovered in *S. cerevisiae* where it was shown to be an HSP90 co-chaperone [1]. HSP90 is responsible for the folding of a many proteins into their native, active state. Substrate recognition is mediated by a range of adaptors called "co-chaperones", with each adaptor recruiting a range of substrates [2]. R2TP is an unusual HSP90 co-chaperone, since it is specialized in quaternary protein folding, i.e. it enables the incorporation of substrates into their final, active complex. For instance, R2TP folds the newly synthesized Rpb1 (RNA Polymerase II largest subunit), so that it can recognize its partners to ultimately build an active RNA Pol II [3]. The list of identified substrates (also called "clients") of R2TP is still growing, with some cellular machines particularly important for cell growth. The first and best-documented R2TP clients are the small nucleolar ribo-nucleo-particles (snoRNPs), which are required for the maturation of ribosomal RNAs [4-6]. Later on, other substrates have been described, including the U4 and U5 spliceosomal snRNAs [7,8], the nuclear RNA polymerases [3,9], and the family of PI3K-like kinases (PIKKs), which comprises mTOR, DNA-PK, ATR, ATM, and TRRAP [10]. Given the role of all these clients in cell growth and proliferation, it was hypothesized that R2TP mediates part of the pro-tumoural effects elicited by HSP90 [6,11]. Newly identified clients involved in DNA damage response corroborate this possibility [12]. Yet, despite its potential role to coordinate cellular functions during cell growth and proliferation, no animal models has yet addressed the specific role of R2TP in tissue function.

In humans, R2TP associates with additional factors to form the R2TP/Prefoldin-like complex, but little is known about the function of these prefoldins [9]. The R2TP core is composed of four subunits: PIH1D1 (also called Nop17), RPAP3 (Spag), and RUVBL1 and RUVBL2 (also called Pontin and Reptin), known to heterodimerize. Unlike PIH1D1 and RPAP3, which are specific to R2TP, RUVBL1 and RUVBL2 are part of numerous complexes [13]. RPAP3 directly binds HSP90 and forms a stable heterodimer with PIH1D1, while RUVBL1 and RUVBL2 are two AAA+ ATPases that form hetero-hexameric and dodecameric structures. The analysis of snoRNP biogenesis suggests that R2TP functions in a stepwise process where HSP90 stabilizes clients before their assembly, followed by the recruitment of additional snoRNP components by R2TP, and ending in the loading of RUVBL1/2 on the client complex [14]. Remarkably, the precise molecular role of RUVBL1 and RUVBL2 still remains elusive, even though these are essential enzymes.

Most of our knowledge about R2TP comes from studies in *S. cerevisiae* and mammalian cell lines. Up to now, few studies investigated the role of R2TP in organism or tissue function. In *S. cerevisiae*, deletion of either Pih1 or Tah1 (homologs of Pih1D1 or RPAP3, respectively) is viable: Δ Pih1 is sick under normal growth conditions, while the role of Tah1 (the homolog of RPAP3) seems restricted to stress conditions [15]. We found that knock-down of *Spaghetti*, the homolog of RPAP3, in *Drosophila*, is lethal at early stages but induces no visible phenotype in tissues [16]. Overall, these data suggest an important role for RPAP3 under stress conditions. In addition, elevated transcript [17] and protein levels (our unpublished data) in colorectal cancer (CRC) samples suggest an involvement for R2TP in colorectal cancer.

In this paper, we characterize the role of RPAP3 in the physiology of the murine intestinal epithelium. For this we generated murine lines in which *RPAP3* can be selectively invalidated in the intestinal epithelium (*VilCreERT2*; *RPAP3^{lox/lox}* mice). Strikingly, our data show that *RPAP3* is necessary to maintain intestinal epithelium integrity. The phenotype we observe in *VilCreERT2*; *RPAP3^{lox/lox}* mice is very similar to that observed upon Wnt pathway inactivation or BRG1 depletion [18]. BRG1 is a central component of a co-activator complex necessary for the Wnt pathway in intestinal epithelium. We hypothesize that BRG1 might be a substrate of R2TP. In addition, we analyze the effect of *RPAP3* heterozygous deletion in two models of CRC, to test the possibility of a therapeutic window to target *RPAP3*.

Results & Discussion

RPAP3, R2TP and the homeostatic epithelium

According to "Protein ATLAS database, RPAP3 was expected to be expressed ubiquitously and uniformly in most human tissues (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000005175-RPAP3/tissue>). This was also the case for Pih1D1 (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000104872-PIH1D1/tissue>). Western blot analysis of murine tissues confirmed a broad expression of RPAP3 in nearly every tissue tested, such as liver, thymus, ovary. To gain insight into the physiological role of *RPAP3* in mammals, we decided to focus on intestinal epithelium because (a) intestinal epithelium represent a chronological view of stem cells cycling to replenish the differentiated cells; (b) published data suggested an role for *RPAP3* in colorectal cancer [17]. Immunostaining of the murine intestinal tract (Figure 1B) against RPAP3 and Ki67 showed a nearly complete co-staining in the Columnar Basal Cells (the "active" stem cell of the epithelium) located in the base of the crypts, as well as in the upper part of the crypt, the "Transitory Amplification" compartment, which represents cycling progenitors before they differentiate and migrate to the top of the villus (Fig. 1B). In contrast, adjacent Paneth cells (recognized by their typical punctuated cytoplasmic staining), which provide a niche for the CBC, were not stained for RPAP3. Furthermore, cells from the mesenchyme were highly RPAP3-positive. Specificity of the RPAP3-staining was verified using epithelial from KO animals (see below). This restricted expression pattern suggested that *RPAP3* plays a key role in the renewal of the intestinal epithelium.

To address the role of *RPAP3* in the turnover of intestinal epithelium, we took advantage of Embryonic Stem cells (ES cells) generated by the KOMP consortium. Site-specific and unique recombination at the *RPAP3* locus in the ES cell line was verified by Southern blot (Figure 2A supp) in KOMP ES Cells H10 - but not clone H11 (Supp. Figure 2A). These ES cells were injected into blastocysts, yielding 8 chimerae, 3 of which transmitted the *RPAP3^{wtsi}* allele (Fig1 A). Genotyping was performed by PCR amplification using primers F5, R5, of the mouse tail genomic DNA (gDNA - Figure Supplemental 2B). In the *RPAP3^{wtsi}* recombinant allele designed by the KOMP consortium, a strong splice acceptor site is introduced before exon 7. The resulting mRNA encodes a *RPAP3^{wtsi}* protein with a truncation after the first TPR domain (figure 2B). Interbreeding of *RPAP^{wtsi/+}* animals did not yield any homozygous *RPAP3^{wtsi/wtsi}* animal, supporting the idea that the truncated protein is hypomorph, thus leading to homozygous lethality (Figure 2C).

To generate a conditional knock-out mutant, we crossed the *RPAP3^{wtsi/+}* mice with mice carrying a transgene encoding the Flipase gene (Flpo) [20]. In the progeny, excision of the Flp-in cassette generated an *RPAP3* allele with the exon 7 flanked by *loxP* sites (Figure 2A). *RPAP3^{fllox}* encodes a protein identical to the wild-type RPAP3 and indeed, there was neither bias in transmission nor any obvious phenotype in *RPAP3^{fllox/fllox}* mice. Excision of exon 7 by the Cre

induces a frame shift with a premature termination codon (PTC). Such mRNA is expected to a target for degradation by the nonsense-mediated decay (NMD) surveillance pathway. To delete exon 7 in the intestinal epithelium, we crossed *RPAP3^{lox/+}* mice with ones carrying a constitutive Cre under the control of the villin promoter: *VilCre*[21]. This driver has been abundantly described: Cre is constitutively expressed in the small and large intestine. Yet, again, we were unable to obtain homozygous *VilCre RPAP3^{lox/lox}* animals, suggesting that (i) *RPAP3^{Δ7}* indeed generates a non-functional mutant; (ii) intestinal expression of *RPAP3* at the early stage of development is necessary (Figure 2C). To bypass this problem, we used a tamoxifen inducible Cre under the control of the villine promoter (*VilCreERT²*): tamoxifen triggers the nuclear translocation of this Cre fused to estrogen receptor (ER), hence allowing the recombination of floxed genes [21]. We obtained numerous animals homozygous for the *RPAP3* floxed allele with the inducible Cre, with a good transmission of the transgene (*VilCreERT²; RPAP3^{lox/lox}*) (Figure 2C). Intra-peritoneal injection of tamoxifen yielded an efficient recombination of the *RPAP3^{fl}* allele in the intestinal epithelium as soon as one day after the first injection, as detected by PCR amplification of genomic DNA from purified epithelial intestinal cells (Supp. Figure 2). Nevertheless, in all further experiments, we injected mice (animals of interest as well as controls) with one dose of tamoxifen at day 0 and day 1, successively to ensure penetrant recombination (cf. scheme on Figure 3).

To verify the role of *RPAP3* in murine intestine, we injected tamoxifen intraperitoneally of *VilCreERT²; RPAP3^{lox/lox}* and *RPAP3^{lox/lox}* littermates, as controls (Figure 3A). Animal behaviour and weight was monitored daily. While *VilCreERT² RPAP3^{lox/lox}* mice showed no sign of alteration during the first 6 days, there was a dramatic weight loss from day 7 on, so that we had to sacrifice most females at day 8 and males at day 10 (Figure 3 SB). In both cohorts, we observed a massive swelling of the small intestine in *VilCreERT² RPAP3^{lox/lox}*, filled with liquid at day 8 or even blood at day 10 (Figure Supp. 3C). Besides, small intestines from *VilCreERT² RPAP3^{lox/lox}* animals were shorter than that of the control *RPAP3^{lox/lox}* (which received the same tamoxifen injection), while colons were similar (Figure S3B). Hematoxylin and Eosin (HE) staining of the small intestine at day 8 and day 10 revealed similar profiles: a completely degraded epithelium, a loss of crypts and villi axis, disappearance of crypts and Paneth cells (recognizable by a characteristic pink dots in their cytoplasm, see Figure 3B, magenta arrows on Day 17 *RPAP3^{lox/lox}* controls). Some characteristic circular, dark crypt-like structures devoid of Paneth cells were detected (see black arrow on Fig. 3B, Day 8 *VilCreERT² RPAP3^{lox/lox}*). In addition, the proximal colons from the same animals were also affected, albeit to a much lesser extent, with mostly enlarged Goblet cells, visible throughout the crypts (Figure S3 C). Collectively, these data show that *RPAP3* is necessary to maintain the integrity of the intestinal epithelium.

Interestingly, the animals with a higher weight appeared to recover after day 10 and were analysed at day 17, when they did not show any sign of suffering. HE staining showed restored tissues, with crypts and villi, yet with irregular morphology (Fig3 B), suggestive of hyperplastic regeneration of the intestinal epithelium. Interestingly, although the colons of *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* mice seemed moderately affected, colons at day 17 clearly showed a hyperplasia with anarchical crypt organization and decreased number of Goblet cells. We are expecting PAS staining to verify this observation (Figure Supp. 3C).

To characterize the consequences of *RPAP3* deletion in the intestine, we performed a short-time kinetics. Two doses of tamoxifen were injected (as described above) to two-month old mice with the following genotypes: *VilCreERT2 RPAP3^{flox/flox}*; *VilCreERT2 RPAP3^{flox/+}* or *RPAP3^{flox/flox}* as controls. Mice were sacrificed every day after the first injection. Immunohistological analysis was performed by Hematoxylin and eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Ki67 staining of the three parts of the intestine and the colon. Colon from all animals looked similar, regardless of their genotype, from day 1 to day 6 (data not shown). In contrast, the small intestine from *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* mice showed a complete disruption of the villi at day 8, with altered crypts and the occurrence of closed, circular crypts (Figure 3B, C and supplemental Fig. 3). This effect was most pronounced in the jejunum (I2), but was also visible in the duodenum (I1) and ileum (I3) (data not shown). At day 7, the global architecture of the intestine was not altered but there was a complete loss of the Ki67 staining, in the crypts and the transitory amplifying compartment (TA) from *VilCreERT2 RPAP3^{flox/flox}* animals. At day 6, the intestine structure was preserved and Ki67 staining was similar in *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* and *RPAP3^{flox/flox}* animals (Figure 4B).

Examination of the crypts revealed a significant loss of the Ki67⁺ cells (corresponding to Columnar Basal Cells) at day 7 - except in the circular, irregular crypts (black arrow, see below). There was no disappearance of the Paneth cells, as observed by HE and PAS staining (figure 3C), as well as by detection of lysozyme, a specific marker of Paneth cells (Fig. 5). Collectively, these results suggest that *RPAP3* is essential for the maintenance of the proliferative cells in the crypts and the TA. This is coherent with its pattern of expression (Figure 1B). Loss of the proliferative cells rapidly results in a degradation of the epithelium of the villi, inability to absorb liquids and swelling of the intestine, explaining the strong phenotype observed in previous experiment.

Of note, at day 8, the intestine of the *VilCreERT2 RPAP3^{flox/+}* was very similar to that of the control *RPAP3^{flox/flox}* (supplemental Figure 3), suggesting that under normal conditions, one copy of *RPAP3* is sufficient and necessary to ensure the regeneration of the intestinal epithelium.

The phenotype observed suggested a crucial role for *RPAP3* in the maintenance of the survival of the CBC stem cells. To check this, we will perform staining for *Olfm4*, a marker specific for the CBC in *VilCreERT2 RPAP3^{flox/flox}*. This phenotype is very reminiscent of the

phenotype described for the KO of *TCF4*[22]. *TCF4* is a critical effector of the Wnt pathway, which is essential for the maintenance of the CBC and the TA. We will also check if the Wnt pathway is affected in the epithelial *VilCreERT2*; *RPAP3^{lox/lox}* cells by qPCR (Figure 4 A). In addition, we generated *Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 RPAP3^{lox/lox}* animals in which the inducible Cre is under the control of the Lgr5+ promoter, and, as such, expressed only in CBC[23]. This driver has mosaic expression and HE staining of intestine did not show any gross alteration. We will perform GFP staining to see if there is a quantitative disappearance of the CBC and Wnt pathway target genes.

Up to now, neither RPAP3 nor R2TP have been associated with Wnt pathway activation. To address this question, we will take advantage of the widely used TOP/FOP functional test of Wnt pathway activity. Briefly, Wnt ligands induce a stabilization and translation of the β -catenin into the nucleus, where it activates the transcription of target genes. In the TOP system, GFP is under the control of a β -catenin responsive promoter. A similar construct, with defective mutations (FOP) is used to monitor background transcription of the GFP reporter [24].

RPAP3 and R2TP have a growing body of substrates. R2TP interacts with several subunits from transcriptional co-activators. This is notably the case for BRG1/SMARCA4 ([25] and our unpublished data), which is a component of the BAF transcriptional co-activator from the SWI/SNF family. BRG1 interaction with TCF4 is required for the transcriptional induction of Wnt target genes [18]. We will verify that RPAP3 does indeed interact with BRG1. We will also test functionally, using in an *in vitro* cellular system, whether R2TP assists BRG1-containing complex assembly.

RPAP3 and colorectal tumorigenesis

Activation of the Wnt pathway is central to colorectal tumorigenesis [26], as removal of one copy of the *APC* gene, which puts a brake on the Wnt pathway, is sufficient to induce colorectal tumorigenesis. Given the role of *RPAP3* on this pathway and, more generally, in cell proliferation, we sought to analyze the role of *RPAP3* on colorectal tumorigenesis. We reasoned that there could be a therapeutic window to target *RPAP3* during CRC by removing one gene copy. We decided to test this hypothesis using two different well-established models of colorectal tumorigenesis:

- (1) a genetic model of *APC* deletion,
- (2) a chemical induction model, i.e. the colitis-associated carcinogenesis (CAC) in which mice are subjected to an injection of azoxymethane (AOM), a potent mutagen, followed by three rounds of dextran-sulphate sodium (DSS) administration in drinking water (Fig 7) [27]. DSS induces inflammation specifically in the colon, so that this protocol mimics the natural situation, where colorectal tumorigenesis is supported by colon inflammation.

In the first model, *VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/+} APC^{flox/+}* and controls *VilCreER^{T2} RPAP3^{+/+} APC^{flox/+}* 2 month-old mice received two tamoxifen injections and were sacrificed 12 weeks after. Intestine and colon were removed, fixed and stained for HE. Dysplasia were monitored according to their surface, with small adenoma (<1% of total volume of the intestinal surface monitored) barely detectable, « medium » adenoma/dysplasia (1%<T<5% total surface). Eventually, advanced tumours exceeding >5% of total surface tumours could be observed sporadically in some colons.

There was a significant difference in the distribution of the different dysplasia observed in the animals ($p<0,0001$), yet the frequency of affected animals was about the same in the two groups, with a high inter-individual variation. In control animals, small and medium dysplasia mostly occurred in the duodenum (F=69 % of controls animals affected by 1 or more dysplasia in duodenum). About the same proportion of *VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/+} APC^{flox/+}* animals showed dysplasia in the duodenum, yet the affected animals had more dysplastic lesions (N= number of dysplasia in all animals/total number of animals*100, N= 96 lesions in duodenum/ 100 controls vs. 144 in controls - see Figure 6B). This suggested that removal of one copy of *RPAP3* supported the appearance of dysplasia. Accordingly, dysplasia were rarely observed in jejunum or ileum from control animals (F (I2)=15% - F (I3)=23%) but much more frequently in *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/+}; APC^{flox/+}* animals (F (I2)=46% - F (I3)= 36%).

Interestingly, in duodenum and jejunum, the proportion between « middle » lesions (surface>1% from total surface) to « small » dysplasia was much lower in the *VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/+} APC^{flox/+}* (32% of all lesions are of middle size in small intestine from controls vs. 9% in *VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/+} APC^{flox/+}* animals). This suggests that removal of one copy of *RPAP3* would restrict the growth of the dysplasia.

In the colon, dysplasia occurred more rarely and consisted of advanced tumours. We classified tumors according to size, i.e. Only one out of 13 controls displayed two huge tumours, one a middle one (n= 15% of population affected), while 7 out of 37 animals of interest showed such huge tumours (n=20% of the population). The distribution between the different dysplasia observed in colons is statistically different ($p<0,05\%$), with again smaller dysplasia in animals lacking one copy of *RPAP3* than in the controls. Due to the relative low number of control mice available it is difficult to draw at present a conclusion for such a final conclusion. We are currently planning complementary experiments to substantiate these observations.

In parallel, we subjected *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/+}* and controls *RPAP3^{flox/flox}* or *VilCreER^{T2}; RPAP3^{+/+}* mice to the AOM/DSS protocol (Figure 7). This treatment induced exclusively lesions in the colon. In this case, we observed major hyperplasia of the epithelium, probably as a response to epithelium inflammation induced by DSS, with some dysplastic area, in all animals, regardless of their genotype. The observed dysplasia appeared to be less aggressive than the one observed

by *APC* allele removal (though animals were observed 19 days latter after the beginning of *RPAP3* deletion). We scored the relative area of hyperplasia, crypt loss, infiltration and dysplasia in the colonic sections. Figure 7 shows results from one experiment (n=7 *VilCreER^{T2}*; *RPAP3^{lox/+}* vs. n=8 control animals). In this experiment, there does not seem to be any major differences between both mouse cohorts. We are presently analysing additional data (with in total n= 42 *VilCreER^{T2}*; *RPAP3^{lox/+}* vs. 46 control mice).

In conclusion, at present it appears that removal of one copy of *RPAP3* favors the appearance on adenoma, on the other, it restricts their proliferation. Colorectal tumorigenesis is the serial accumulation of mutations, which affect primarily the *APC* and/or the Wnt pathway and is then followed by additional mutations [28]. In our setting, we only remove one copy of *RPAP3* because the homozygous KO is lethal. Under these conditions, *RPAP3* seems to have little effect on Wnt activation. However, R2TP is known to stabilize ATR, ATM and DNAPK, involved in the response to DNA damage [29]. We speculate that *RPAP3* removal might diminish active ATM, ATR and DNAPKs, and thereby favor the accumulation of mutations leading to the occurrence of adenoma. To test this, we plan to stain the intestinal sections for γ H2AX, a marker of DNA damage, to see if we detect increased signals upon *RPAP3* removal. In contrast, it seems that the adenoma have a more limited spread, as measured by surface occupancy. It is tempting to speculate that this results from a decreased metabolism of the tumor, if there is less mTOR, ribosomal activity and transcription.

Material & methods

Mice generation and treatments

Mouse experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals. *RPAP3^{wtsi/+}* mice were generated from ES cells obtained from KOMP, as described in the paper. Mice were bred in an SOPF animal facility and maintained during the experiment in an SPF animal facility. Naive mice were minimum 6 weeks old and are euthanized by CO₂ and isofluran. To activate the CreER^{T2}, controls and animals of interest received two intra-peritoneal (IP) injection of 2mg tamoxifen each. The entire small intestine (cut in 3 parts) and colon were flushed with PBS, then with neutral buffered formalin (4% formaldehyde) and fix in 24h, dehydrated, and embedded in paraffin.

For colitis-associated carcinogenesis mice were treated as described previously (Rocha et al EMBO). In brief, mice were intraperitoneally injected with azoxymethane (AOM), followed by three cycles of 2.5% (w/v) dextrane sodium sulphate (DSS) administered in the drinking water (Figure 1A). In between the cycles the mice received no treatment for 2 weeks.

Histology and immunostainings

For histological analysis, tissue sections (4 µm thick) were deparaffinised and rehydrated.

They were stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Alcian blue and Periodic Acid Schiff staining (PAS) for preliminary analysis.

For immunostainings, tissue sections were deparaffinised, rehydrated and subsequently subjected to heat induced antigen retrieval by immersing them, depending on the antibody, either in a water bath with a sodium citrate buffer (pH 6) or an EDTA buffer (pH 9).

Immunohistochemistry was performed using a Dako autostainer (Dako, Glostrup, Denmark).

After neutralization of the endogenous peroxidase activity, the sections were incubated with the following primary antibodies: polyclonal anti Ki67 antibody (clone SP6, Spring Biosciences, M3064), polyclonal anti cleaved caspase-3 antibody (clone Asp175, Cell Signalling; 9661). They were respectively used at 1:100 and 1:2000 dilutions with an incubation time of 30 min.

Antibody was visualized using the Envision® system (Dako). Diaminobenzidine (Dako) was used as the chromogen and the sections were lightly counter-stained with Hematoxylin.

All slides and immunostainings were prepared by RHEM platform and visualized with a NanoZoomerslide scanner controlled by the NDP.view software (MRI platform).

Others immunostaining : the intestine sections were deparaffinised, rehydrated and heat in water bath with a sodium citrate buffer (pH6). They were blocked 20 min with a blocking solution (TBS 1X, 2% serum of secondary antibody specie, 0,1 % Triton).

They were incubate with primary antibody (anti-RPAP3: clone 19B11 1/50; and anti-Ki67 (ab16667; AbCam)). Slides were washed twice times with 0.1% PBS-Tween before incubation with fluorescent secondary antibodies conjugated with either Alexa 488, cyanin-3, or cyanin-5, and Hoechst at 2 µg ml⁻¹ in PBS-Triton X-100 0.1%.

For revelation, we used Tyramide Signal Amplification kit (TSA).

Histological grading of AOM/DSS-induced tumors was determined with blinded genotype according to the described classification of intestinal neoplasia (Washington et al., 2013).

Antibodies, cells and plasmids

RPAP3 was detected by a murine monoclonal antibody developed by the lab. (19B11)

Isolation of epithelial cells from intestine and colon. Intestine and colon were isolated and flushed with cold PBS. Colon and the 3 intestine fragments were cut open length-wise, then kept in 10 ml cold wash buffer (PBS, 2% FBS and antibiotics). Tubes were shaken several times by hand to wash the fragments and put into 15 ml falcon tube containing 10 ml CE buffer (PBS, 1% BSA, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5,6 mM glucose). Tubes were placed on a vertical shaker at 37°C for 30 min. After removing tissue, cells were collected by centrifugation at 1410 rpm for 7 min. They were washed by 10ml wash buffer. Collected cells were split in different tubes depend of the use.

DNA extraction. Samples are incubated in 200 µl of lysis buffer (KCl 0,5M ; TRIS pH8 5mM ; Gelatin 5mg/ml : NP40 at 0,45% ; Tween 20 0,45 %) with 4 µl of Proteinase K at 55°C overnight. Proteinase K was inactivated 5min at 95°C. 1 µl was used for PCR.

Primer genotyping

Name	Sequence
F5	GGTGCCACAGTGTGAGTG
R5	TGCCTCCTGACTCACTACAG
R6	ACCGTGTGCTACGTCCTGCG
CREERT2-F	TTACGGCGCTAAGGATGACT
CREERT2-R	AAGGCCAGGCTGTTCTTCTT

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francisca Z. from Pasteur facility for generation of chimera. We thank people from the animal facilities and organizing committees in Montpellier (RAM) who supported the breeding of these mice. We do not thank Charles River for animal house contamination and total absence of consideration for the time, money and energy wasted. We thank the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM) facility and Montpellier RIO Imaging (MRI) for processing our animal tissues. We thank “La Ligue Nationale contre le Cancer” and INCa for funding. CM was funded by a grant for Ph. D. student from La Ligue Nationale Contre le Cancer. Research in the lab. of EB is funded by La Ligue Contre le Cancer. Research in the lab. of MH and BPB is funded by grants from INCa (#...).

REFERENCES

- [1] R. Zhao, M. Davey, Y.-C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, et al., Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone, *Cell*. 120 (2005) 715–727. doi:10.1016/j.cell.2004.12.024.
- [2] G.E. Karagöz, S.G.D. Rüdiger, Hsp90 interaction with clients, *Trends Biochem. Sci.* 40 (2015) 117–125. doi:10.1016/j.tibs.2014.12.002.
- [3] S. Boulon, B. Pradet-Balade, C. Verheggen, D. Molle, S. Boireau, M. Georgieva, et al., HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II, *Mol. Cell*. 39 (2010) 912–924. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.023.
- [4] R. Zhao, Y. Kakihara, A. Gribun, J. Huen, G. Yang, M. Khanna, et al., Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 563–578. doi:10.1083/jcb.200709061.
- [5] S. Boulon, N. Marmier-Gourrier, B. Pradet-Balade, L. Wurth, C. Verheggen, B.E. Jádý, et al., The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 579–595. doi:10.1083/jcb.200708110.
- [6] S. Boulon, E. Bertrand, B. Pradet-Balade, HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression, *RNA Biol.* 9 (2012) 148–154. doi:10.4161/rna.18494.
- [7] A. Malinová, Z. Cvačková, D. Matějů, Z. Hořejší, C. Abéza, F. Vandermoere, et al., Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 1579–1596. doi:10.1136/jmg.2005.031682.
- [8] P. Cloutier, C. Poitras, M. Durand, O. Hekmat, E.M. Fiola-Masson, A. Bouchard, et al., R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein, *Nature Communications*. 8 (2017) 1–14. doi:10.1038/ncomms15615.
- [9] P. Cloutier, B. Coulombe, New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol.* 88 (2010) 211–221. doi:10.1139/o09-173.
- [10] Z. Hořejší, H. Takai, C.A. Adelman, S.J. Collis, H. Flynn, S. Maslen, et al., CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability, *Mol. Cell*. 39 (2010) 839–850. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.037.
- [11] P. von Morgen, Z. Hořejší, L. Macurek, Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress, *Front Genet.* 6 (2015) 69. doi:10.3389/fgene.2015.00069.
- [12] P. von Morgen, K. Burdova, T.G. Flower, N.J.O.A. Reilly, S.J. Boulton, S.J. Smerdon, et al., MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex, 36 (2017) 4943–4950. doi:10.1038/onc.2017.99.
- [13] S. Jha, A. Dutta, RVB1/RVB2: Running Rings around Molecular Biology, *Mol. Cell*. 34 (2009) 521–533. doi:10.1016/j.molcel.2009.05.016.
- [14] J. Bizarro, C. Charron, S. Boulon, B. Westman, B. Pradet-Balade, F. Vandermoere, et al., Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control, *J. Cell Biol.* 207 (2014) 463–480. doi:10.1083/jcb.201404160.dv.
- [15] W.A. Houry, Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex, (2014) 1–57.
- [16] N.E.H. Benbahouche, I. Iliopoulos, I. Török, J. Marhold, J. Henri, A.V. Kajava, et al., *Drosophila* Spag is the homolog of RNA polymerase II-associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 6236–6247.

- doi:10.1074/jbc.M113.499608.
- [17] S.G. Kim, G.R. Hoffman, G. Poulogiannis, G.R. Buel, Y.J. Jang, K.W. Lee, et al., Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex, *Mol. Cell.* 49 (2013) 172–185. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.003.
- [18] The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation, (2017) 1–9.
- [20] A. Kranz, J. Fu, K. Duerschke, S. Weidlich, R. Naumann, A.F. Stewart, et al., An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase, *Genesis.* 48 (2010) 512–520. doi:10.1002/dvg.20641.
- [21] F. El Marjou, K.-P. Janssen, B. Hung-Junn Chang, M. Li, V.R. Hindie, L. Chan, et al., Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium, *Genesis.* 39 (2004) 186–193. doi:10.1002/gene.20042.
- [22] J.H. van Es, A. Haegebarth, P. Kujala, S. Itzkovitz, B.K. Koo, S.F. Boj, et al., A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2012) 1918–1927. doi:10.1128/MCB.06288-11.
- [23] N. Barker, J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, et al., Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature.* 449 (2007) 1003–1007. doi:10.1152/ajpgi.00415.2001.
- [24] A. Zeuner, M. Todaro, G. Stassi, R. De Maria, Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic, *Stem Cell.* 15 (2014) 692–705. doi:10.1016/j.stem.2014.11.012.
- [25] C. Jeronimo, D. Forget, A. Bouchard, Q. Li, G. Chua, C. Poitras, et al., Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme, *Mol. Cell.* 27 (2007) 262–274. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.027.
- [26] N. Barker, R.A. Ridgway, J.H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, et al., Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature.* 457 (2009) 608–612. doi:10.1038/nature07602.
- [27] C. Rocha, L. Papon, W. Cacheux, P. Marques Sousa, V. Lascano, O. Tort, et al., Tubulin glycosylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon, *Embo J.* 33 (2014) 2247–2260. doi:10.15252/embj.201488466.
- [28] D.M. Muzny, M.N. Bainbridge, K. Chang, H.H. Dinh, J.A. Drummond, G. Fowler, et al., Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer, *Nature.* 487 (2012) 330–337. doi:10.1038/nature11252.
- [29] Z. Hořejší, H. Takai, C.A. Adelman, S.J. Collis, H. Flynn, S. Maslen, et al., CK2 Phospho-Dependent Binding of R2TP Complex to TEL2 Is Essential for mTOR and SMG1 Stability, *Mol. Cell.* 39 (2010) 839–850. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.037.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: RPAP3, a core component of the R2TP, is strongly expressed in dividing cells from the intestinal epithelium (A) Schematical representation of the R2TP co-chaperone with its partner HSP90 and its substrates, with eventual role in intestine. (B) Immuno-fluorescent co-staining for RPAP3 (cytoplasmic, white, using 19B11 antibody) and Ki67 (nuclear, red) detect the same cells in the crypts and the transitory amplification (TA) compartment. Cell nuclei are labelled by Hoechst dye (blue). On the left is a schematical representation of the intestinal crypts.

Figure 2: Murine *RPAP3* alleles and their viability (A) Schematic representation of the different *RPAP3* alleles generated and described in this paper; black arrows represent the primers used to discriminate between the different alleles for genotyping. (B) Mutant RPAP3 proteins encoded by the above-described alleles. (C) Viability and characteristics of the strains carrying the different *RPAP3* alleles: O/E indicates the number of animals obtained (O) as compared to the animals expected (E) from several crosses.

Figure Supplemental 2: (A) Southern blot of genomic DNA shows a correct recombination of the *wtsi* construct at the *RPAP3* locus in the H10 clone but not in the H11. (B) PCR on genomic DNA from intestinal epithelial cells shows that recombination occurs as soon as one day after tamoxifen injection to the *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/flox}* mice, and persists for at least 4 days (amplification of a band corresponding to *RPAP3^{Δ7}*). As a control, PCR on genomic DNA from *RPAP3^{flox/flox}* mice intestinal epithelial cells amplifies a band corresponding to the floxed, unrecombined *RPAP3* allele.

Figure 3: Invalidation of *RPAP3* induces a quick destruction of the intestinal epithelium (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Hematoxylin and eosin staining (HE) of the jejunum shows epithelium degradation at day 8, and anarchical villi and crypts at day 17, in the survivors (see text). Intestinal epithelium from control *RPAP3^{flox/flox}* mice showed no alteration, even at day 17 after the first tamoxifen injection. Pink arrows show Paneth cells and purple arrow, typical circular crypts observed at day 8. The scale is identical for all pictures, with bar representing 250 μm .

Figure Supplemental 3: Invalidation of *RPAP3* induces a quick destruction of the intestinal epithelium, which compromises the survival of animals (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Evolution of relative body weight in females (left hand) and males (right hand) following tamoxifen injection. Length of the small intestine and colon from females

at day 8 or males at day 10. (C) Small intestine from *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* animals is swelled with liquid (left panel, red arrow) or blood (central panel, red arrow), while that of control *RPAP3^{flox/flox}* animals is filled with food (right panel, blue arrow). (D) Hematoxylin and Eosine staining of the colon shows a mild phenotype at day 8 or 10 but an anarchical organization at day 17 (compare with that observed in control *RPAP3^{flox/flox}* animals). The scale is identical for all pictures, with bar representing 250 μm .

Figure 4: Invalidation of RPAP3 compromises the CBC and TA cells. (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Hematoxylin and eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Ki67 staining of jejunum from *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* shows that, at day 7, the Ki67⁺ cells are absent from the crypts and the transient amplification compartment, leading to a degradation of the epithelium at day 8. *RPAP3^{flox/flox}* mice are shown as controls. Scale is identical for all pictures, with bar representing 100 μm . (C) Insets of crypts show specific disappearance of Ki67⁺ staining in the crypts, but not of Paneth cells (pink arrows). Circular crypts visible at day 8 (purple arrow) are highly Ki67⁺. Scale is identical for all pictures, with bar representing 100 μm .

Figure 4 supplemental: Invalidation of RPAP3 compromises the CBC and TA cells. (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Wider field view from Hematoxylin and eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Ki67 staining of jejunum from *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* presented in Figure 4 (B). Circular crypts visible at day 8 (purple arrow) are highly Ki67⁺. Scale is identical for all pictures, with bar representing 250 μm .

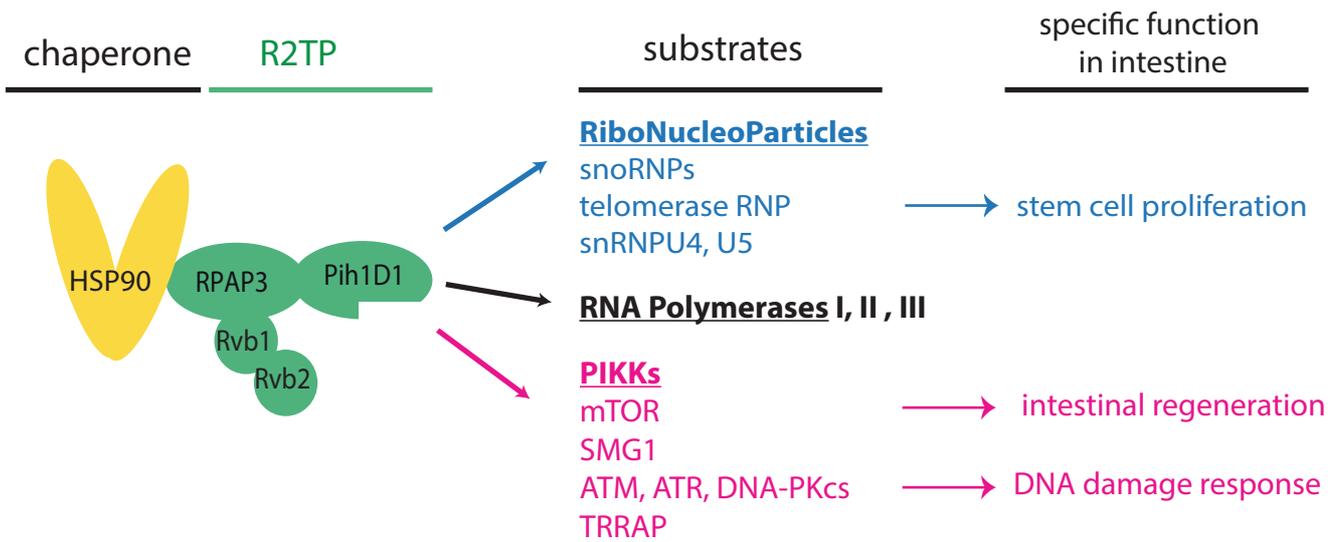
Figure 5: Invalidation of RPAP3 does not affect Paneth cells nor β -catenin staining (A) Lysozyme staining (typical for Paneth cells) in jejunum remains at the bottom of the crypts at day 6 and day 8 after tamoxifen injection to *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* or control *RPAP3^{flox/flox}* mice. Scale is identical for all pictures, with bar representing 100 μm . (B) β -catenin staining is still detectable in the crypts and epithelium from *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* mice jejunum, 6 and 8 days after the first tamoxifen injection. Scale is identical for all pictures, with bar representing 100 μm .

Figure 6: RPAP3 prevents intestinal tumorigenesis by genetic induction (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Repartition of the different dysplasia types (according to their size, relative to the analysed surface) is significantly different in controls and *VilCreERT2 APC^{flox/+} RPAP3^{flox/flox}* mice, with a much higher incidence of small lesions but less dysplasia of middle size upon removal of one copy of *RPAP3*. (C) Hematoxylin and eosin staining

of whole duodenum show multiple adenomas of small (surface <1% of total - black arrows) and middle size (surface <5% of total - pink arrows). Bar is 5 mm. Inset magnification shows a typical small adenoma (surface <1% total). Bar is 200 μ m. (D) HE and PAS staining of whole colon show typical unique, large dysplasia of advanced grade (surface >5% of total - empty arrows). Bar is 2,5 mm.

Figure 7 RPAP3 prevents intestinal tumorigenesis by AOM/DSS induction (A) Schematic representation of the experimental setting. (B) Mean repartition of the different aspects of the colonic epithelium after chemical induction of tumorigenesis. (C) Relative body weight varied similarly in controls and *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}* animals during the experiment (right hand: red line *VilCreERT2; RPAP3^{flox/flox}*, blue line control animals, which were either *VilCreERT2; RPAP3^{flox/+}* or *RPAP3^{flox/flox}*). (C) Hematoxylin and eosin staining of whole duodenum shows hyperplasia and dysplasia. Bar is 5 mm. Insets show HE, PAS and Ki67 staining of the indicated region, with hyperplasia (black arrow) and dysplasia (purple arrow). All three insets have the same scale, with bar representing 1mm.

Figure 1A



B

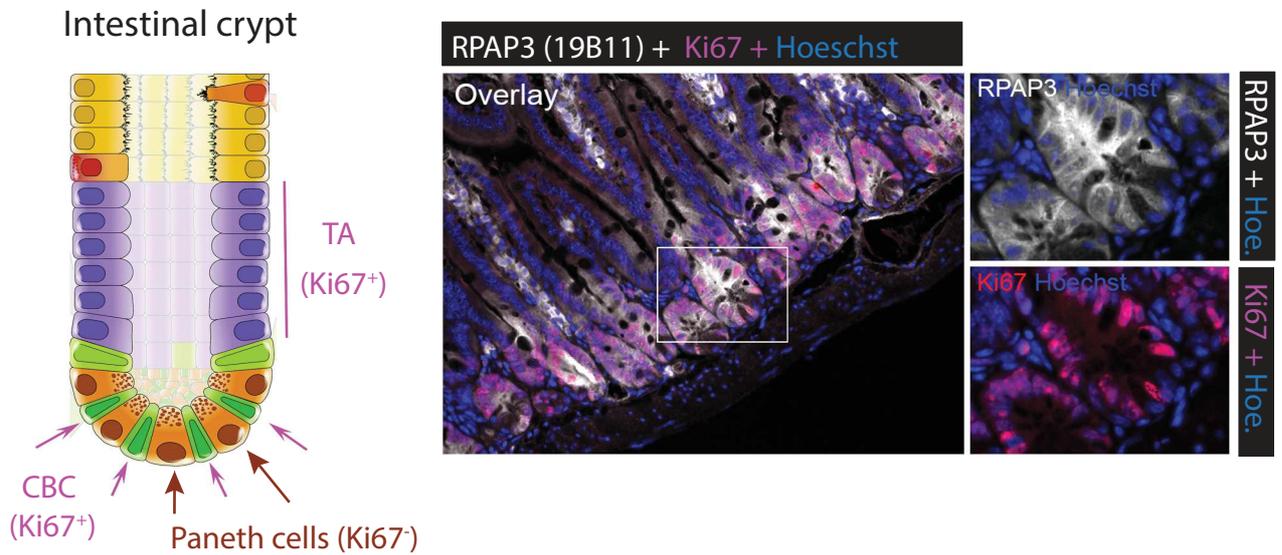
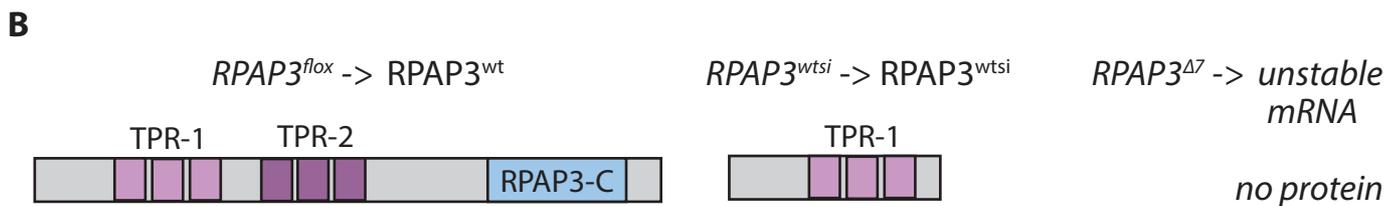
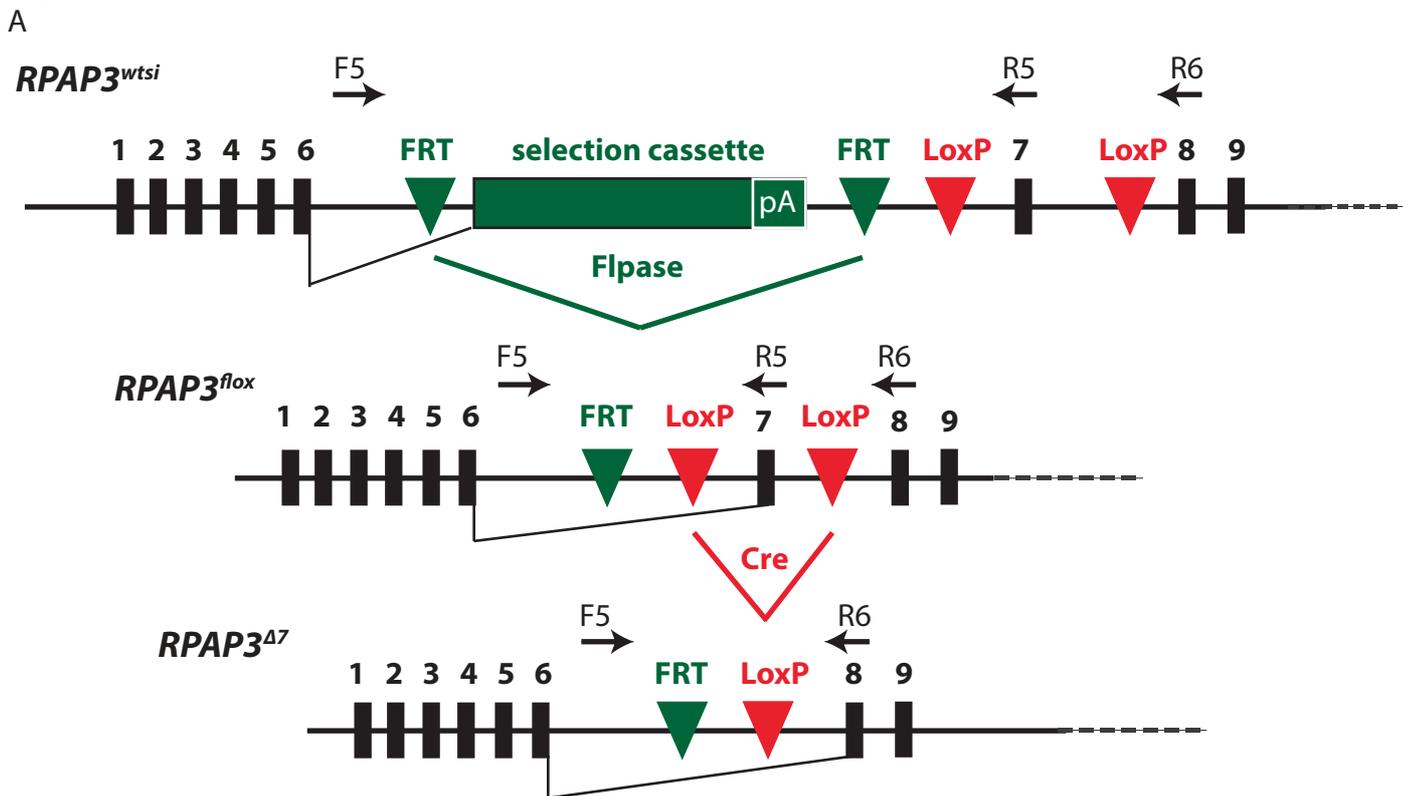


Figure 2

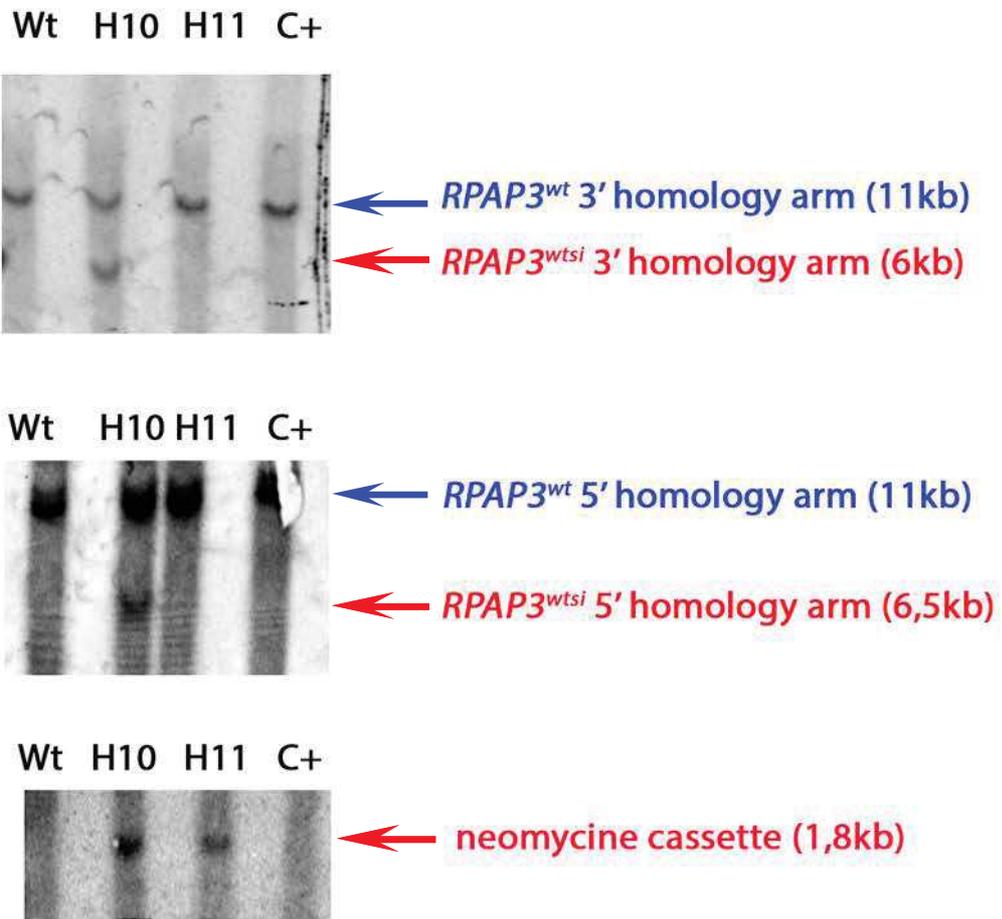


C

genotype	O/E	characteristics
<i>RPAP3^{wtsti/wtsti}</i>	0/12	constitutive and ubiquitous expression of a truncated RPAP3
<i>VilCre RPAP3^{flox/flox}</i>	0/16	constitutive KO of <i>RPAP3</i> in intestinal epithelium
<i>VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/flox}</i>	76/73	tamoxifen-inducible KO of <i>RPAP3</i> in intestinal epithelium
<i>VilCreER^{T2} RPAP3^{flox/+}</i>	38/36	tamoxifen-inducible KO of one <i>RPAP3</i> copy in intestinal epithelium
<i>VilCreER^{T2} APC^{flox/+} RPAP3^{flox/+}</i>	49/49	tamoxifen-inducible KO of one copy of <i>APC</i> and <i>RPAP3</i> in intestinal epithelium
<i>Lgr5GFPCCreER^{T2} RPAP3^{flox/flox}</i>	40/39	tamoxifen-inducible KO of <i>RPAP3</i> in <i>Lgr5</i> ⁺ CBC, which are GFP ⁺

Figure S2

A



B

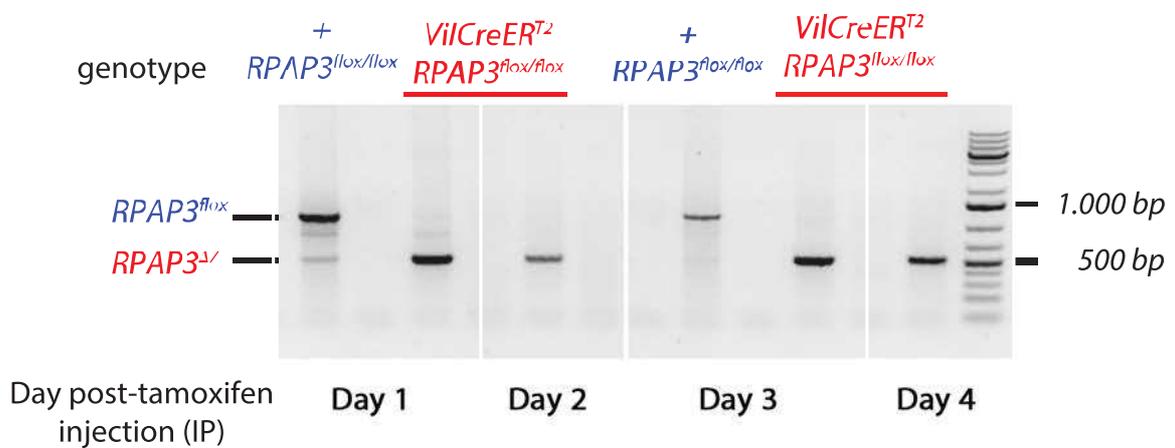
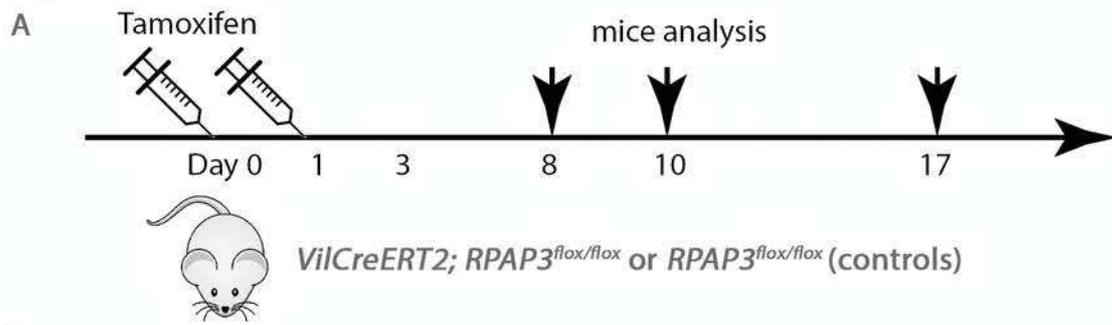
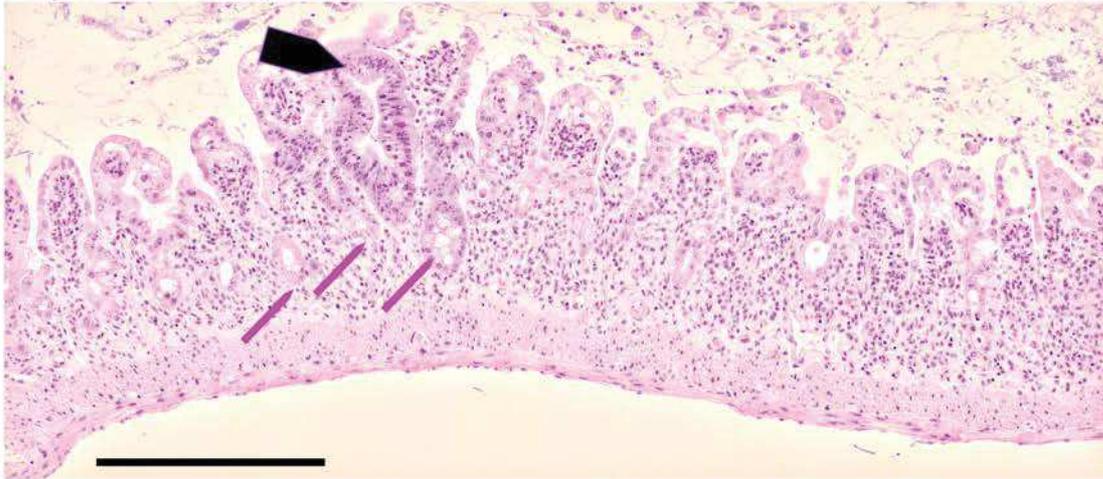


Figure 3

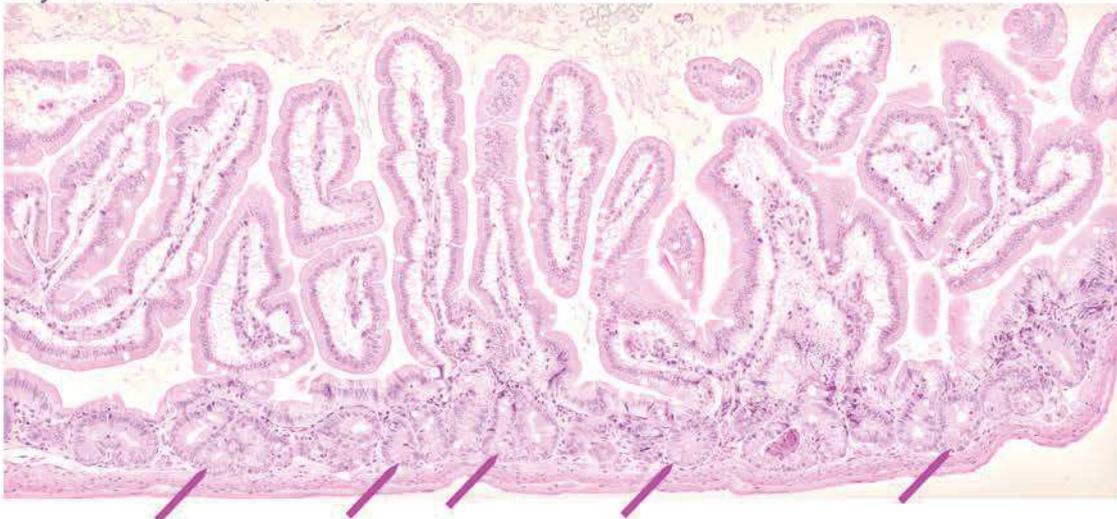


B

Day 8 *VilCreERT2; RPAP3^{lox/lox}*



Day 17: *VilCreERT2; RPAP3^{lox/lox}*



Day 17: control mice *RPAP3^{lox/lox}*

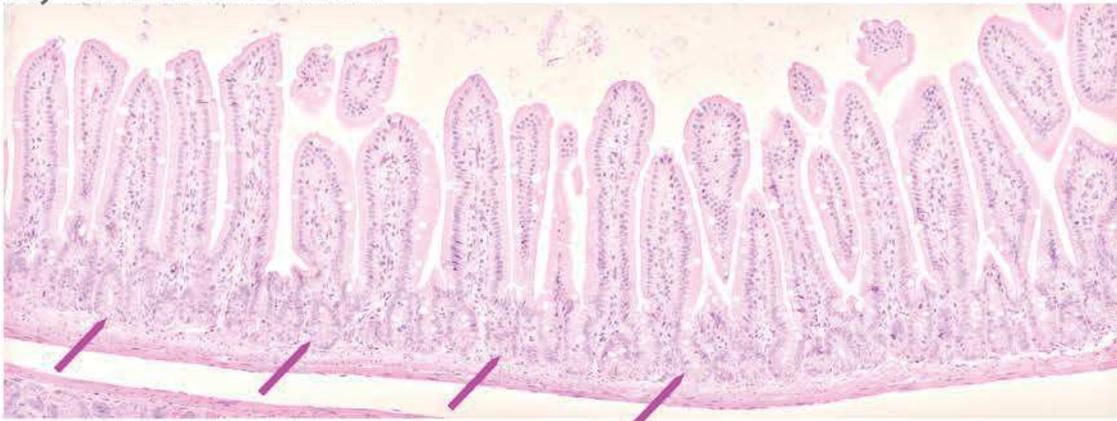
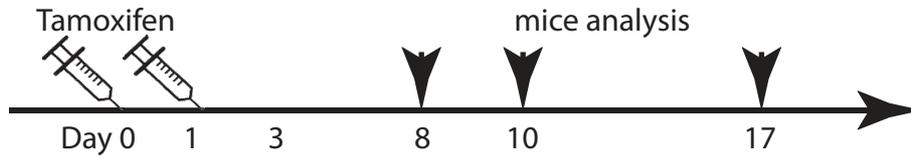
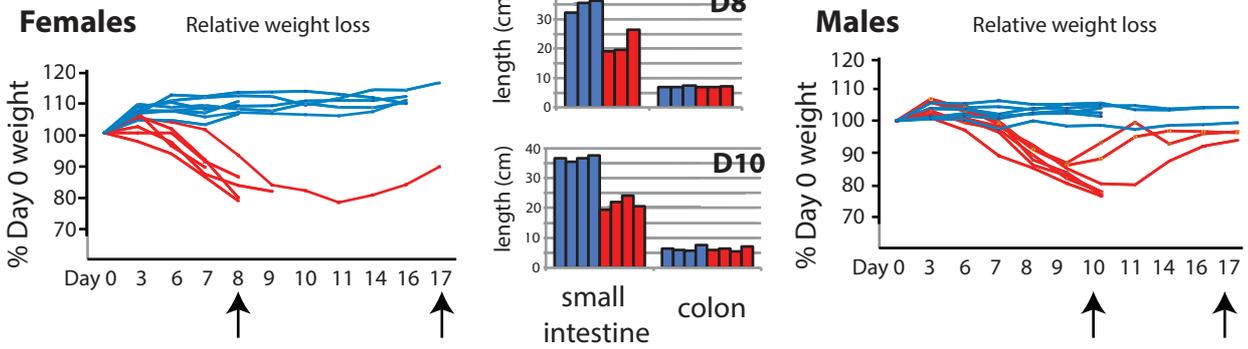


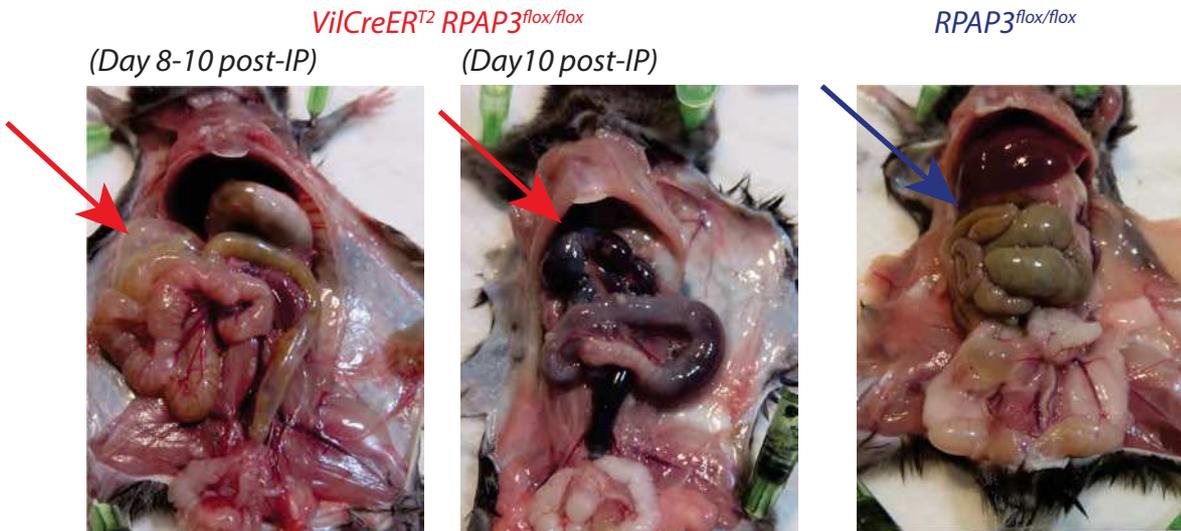
Figure Supplemental 3 A



B



C



D

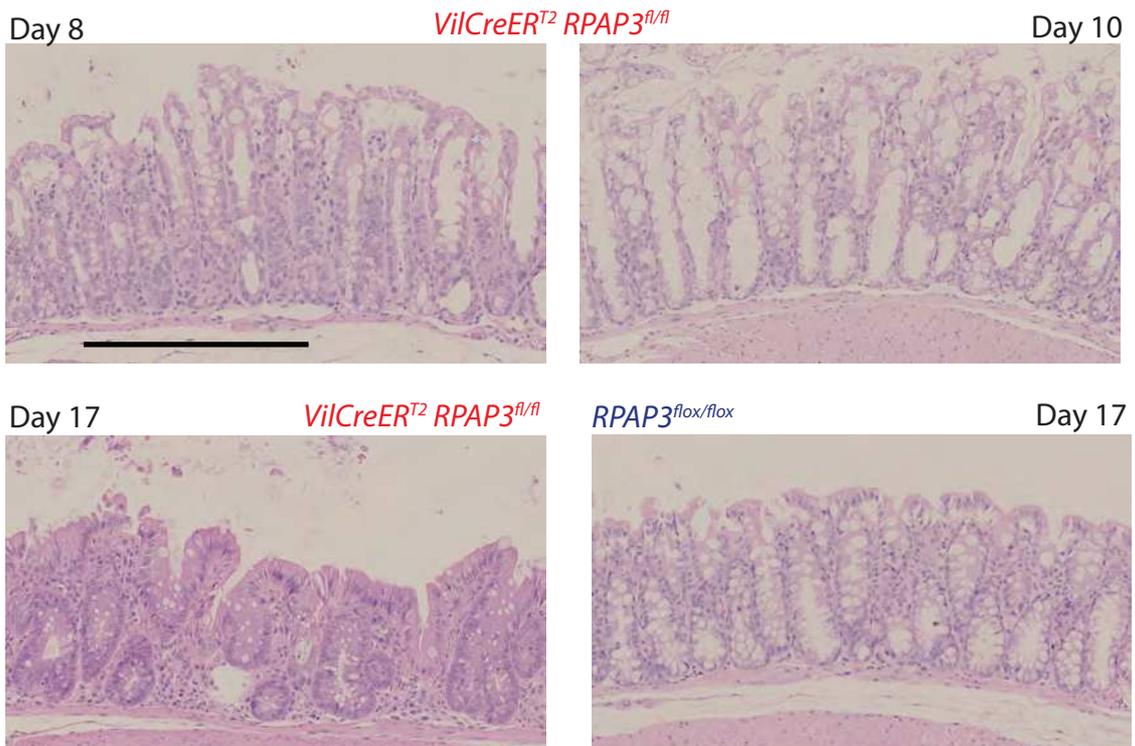


Figure 4

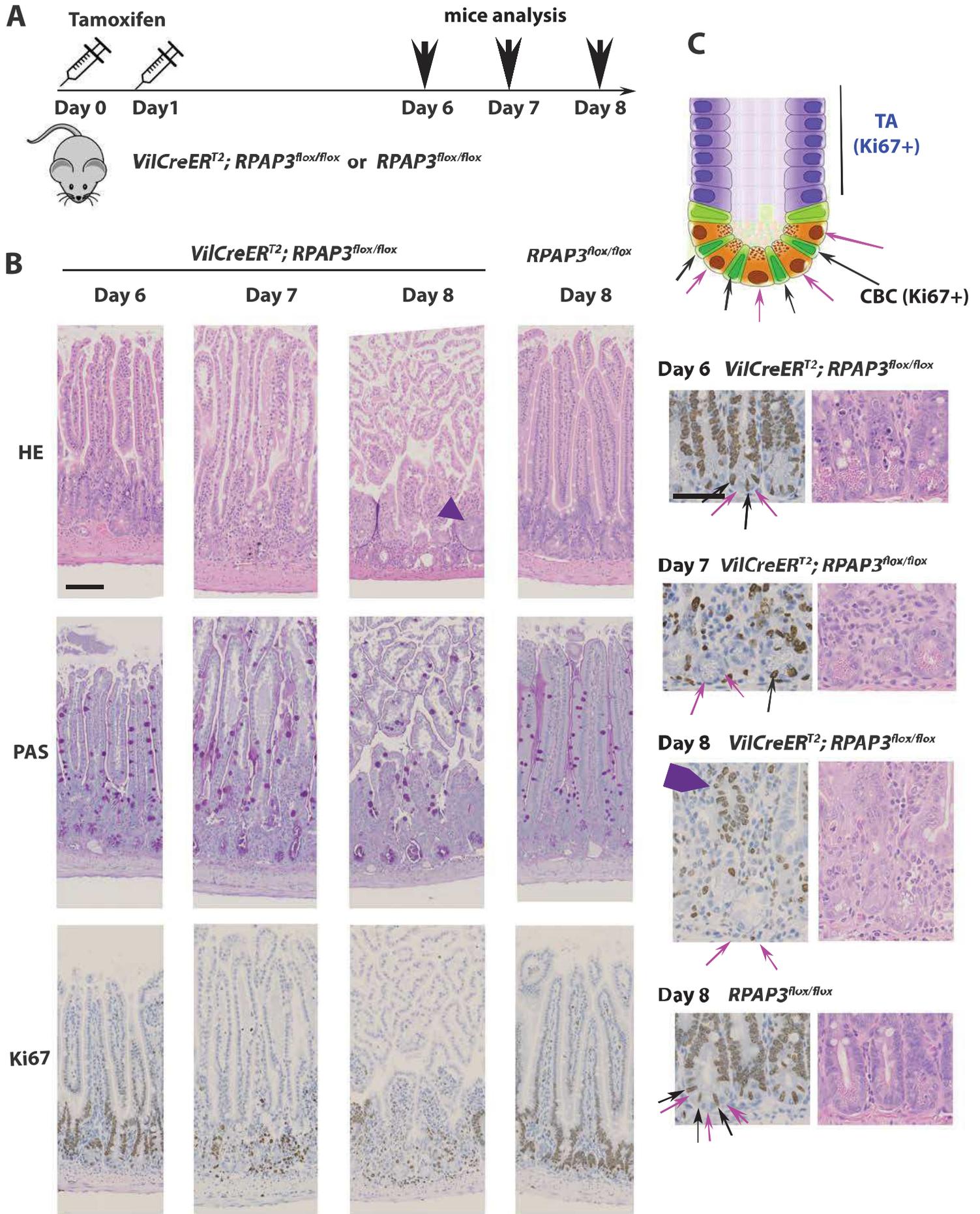
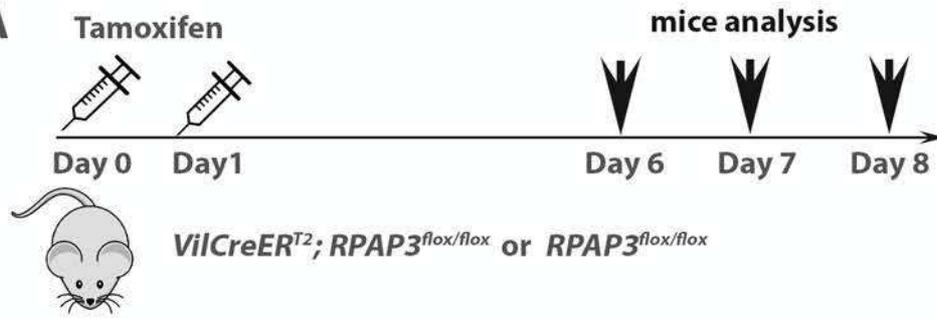
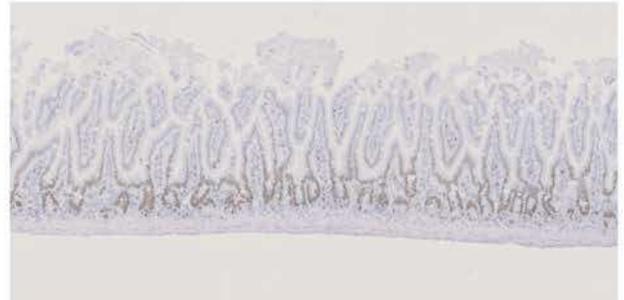
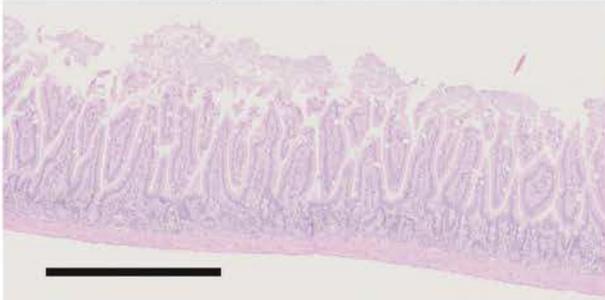


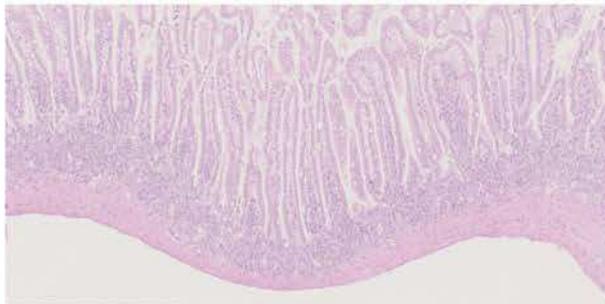
Figure Supp.4 **A**



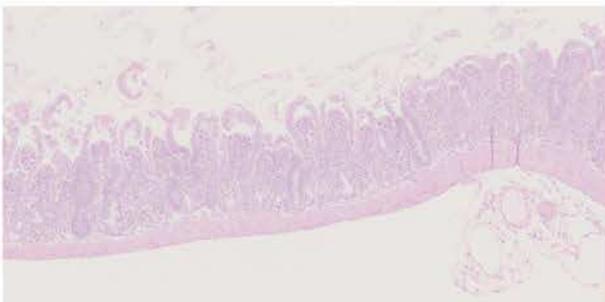
Day 6 *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/flox}*



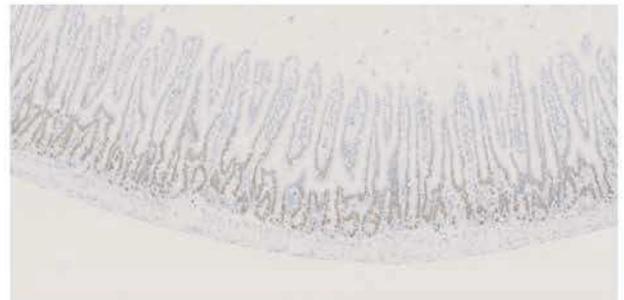
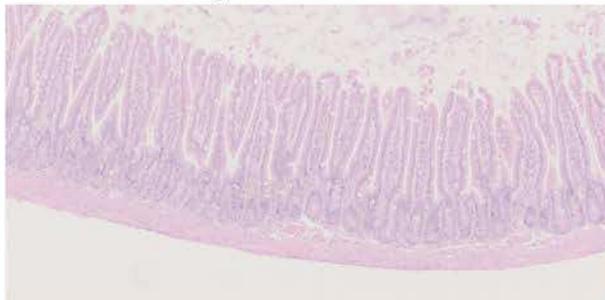
Day 7



Day 8



Day 8 *VilCreER^{T2}; RPAP3^{flox/+}*



Day 8 *RPAP3^{flox/flox}*

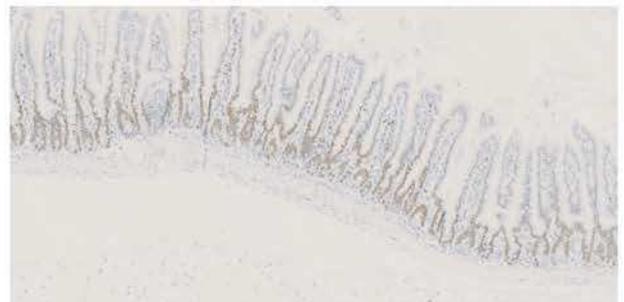
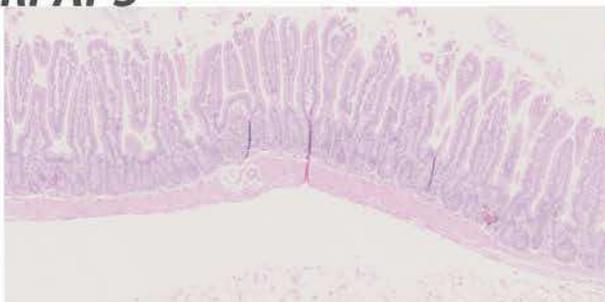
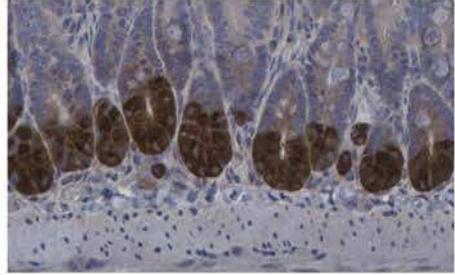
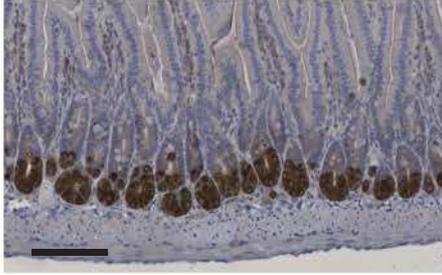


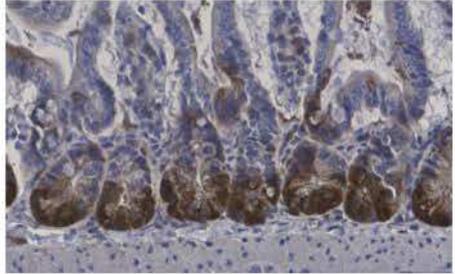
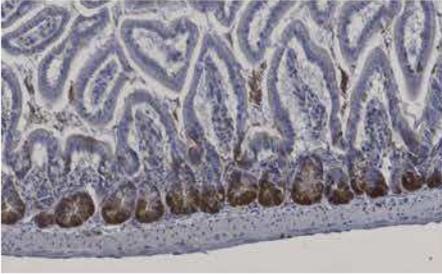
Fig. 5

(A) Lysozyme

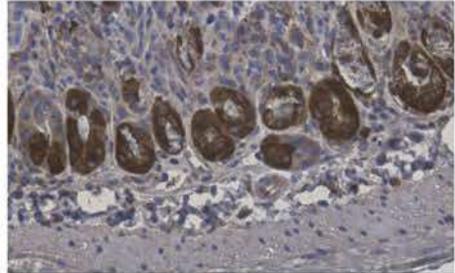
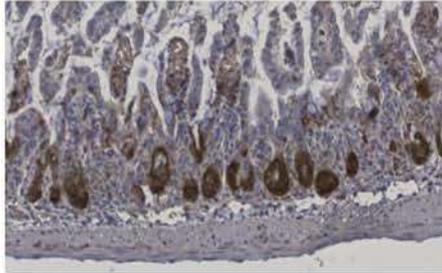
RPAP3^{flx/flx}
Day 6



VilCreER^{T2}; RPAP3^{flx/flx}
Day 6

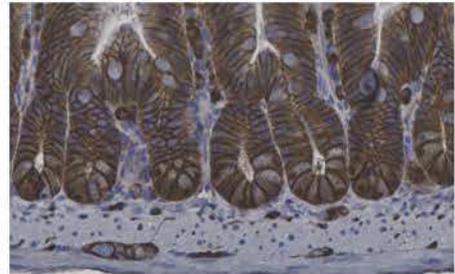
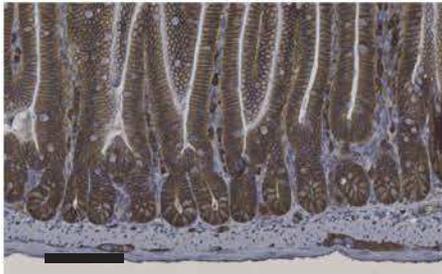


VilCreER^{T2}; RPAP3^{flx/flx}
Day 8

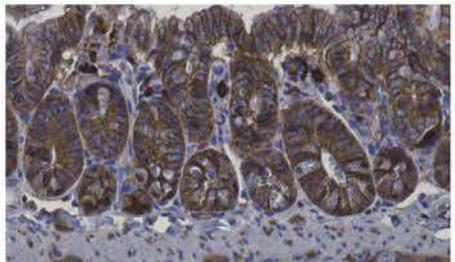
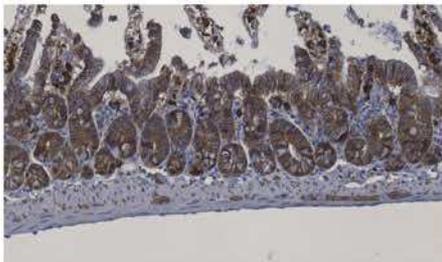


(B) β -catenin

RPAP3^{flx/flx}
Day 6



VilCreER^{T2}; RPAP3^{flx/flx}
Day 6



VilCreER^{T2}; RPAP3^{flx/flx}
Day 8

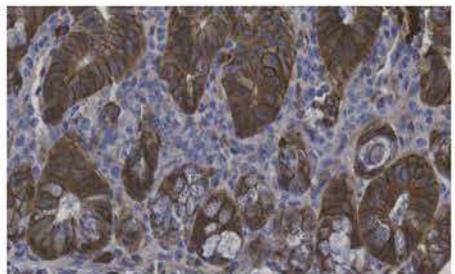
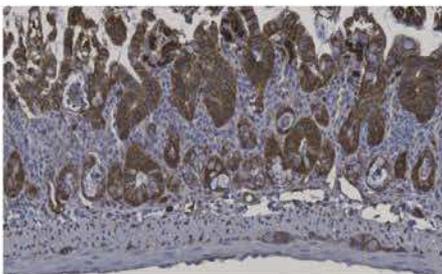


Figure 6A

tamoxifen



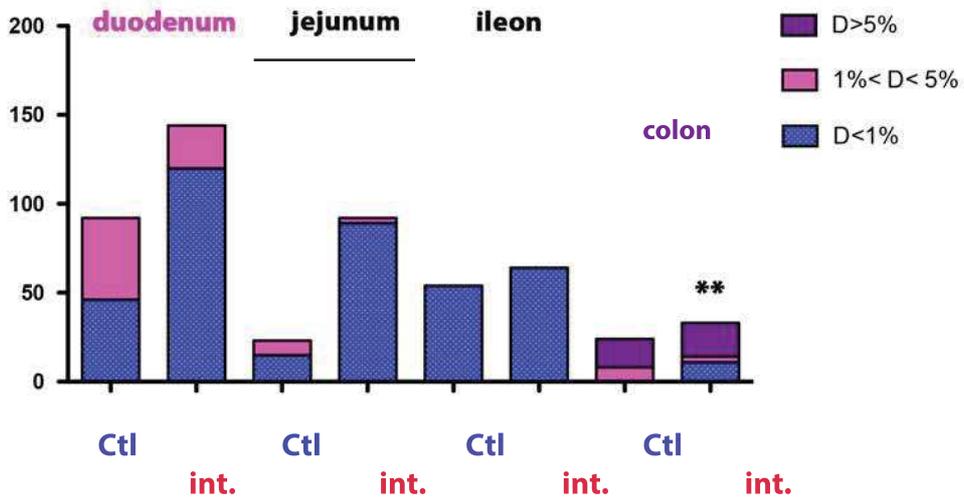
Day 0 Day 1



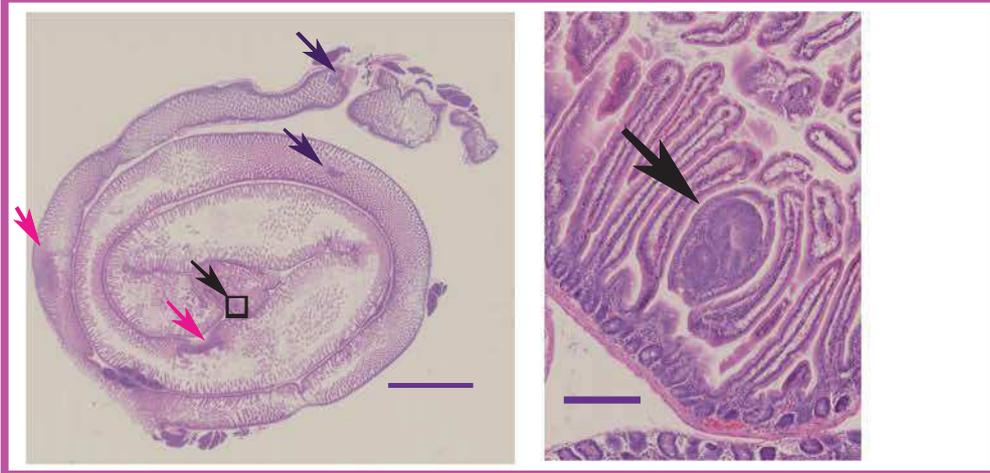
VilCreER^{T2}; APC^{flox/+}; RPAP3^{flox/+}
VilCreERT²; APC^{flox/+}; RPAP3^{+/+}

Day 84
(12 weeks)

B



C



D

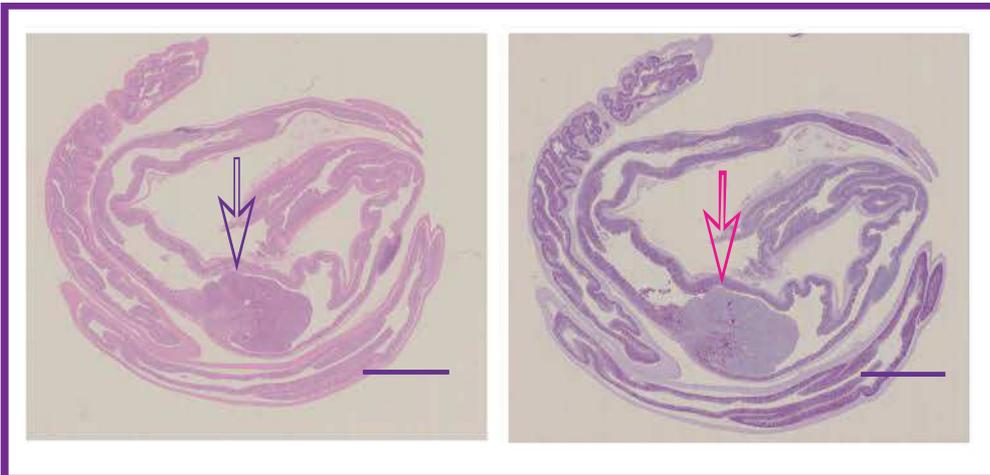
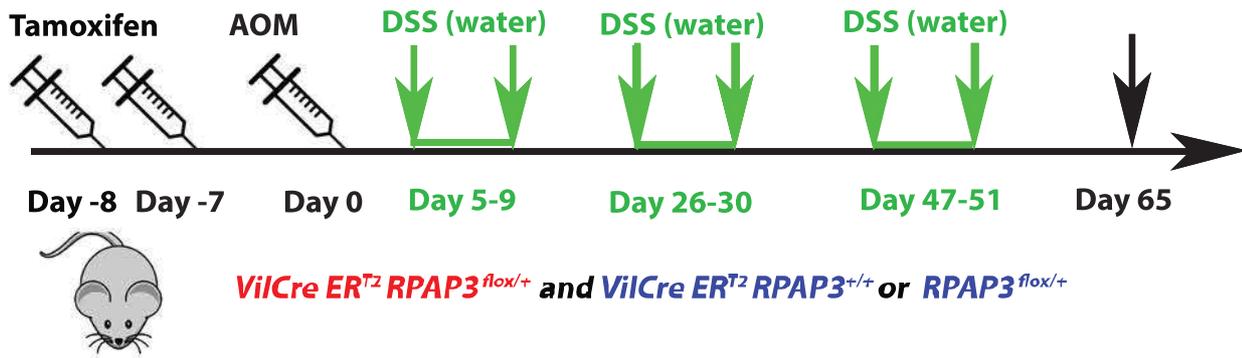
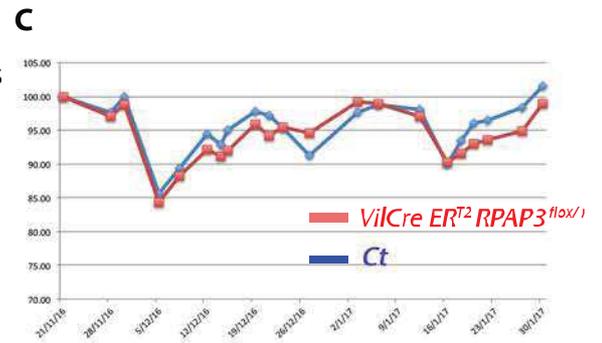
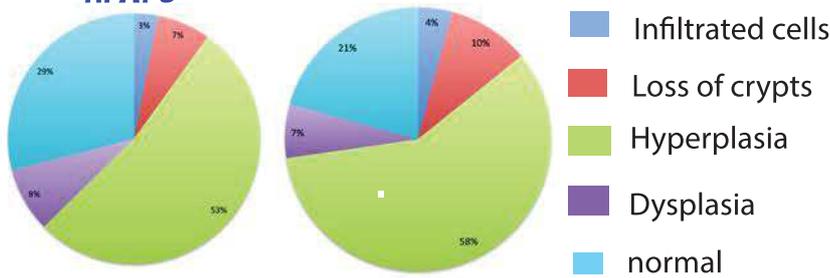


Figure 7 A



B *ViICre ER^{T2} RPAP3^{+/-}* *RPAP3^{flox/+}* *ViICre ER^{T2} RPAP3^{flox/+}*

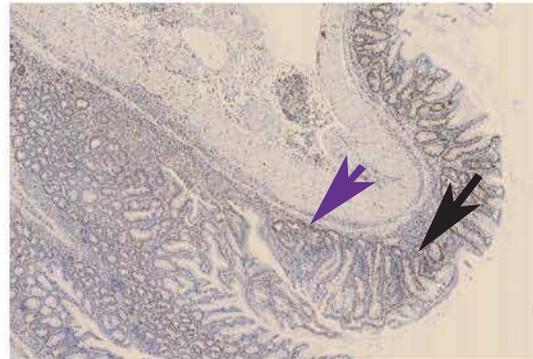


D

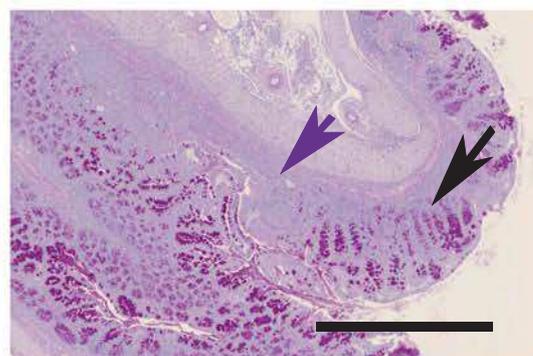
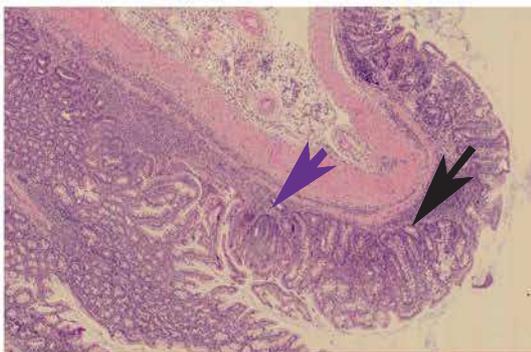
HE



Ki67



PAS



B. Mise en évidence d'un nouveau complexe tissu spécifique, le R2SP, apparenté au complexe R2TP

1. Introduction

Le complexe R2TP est un co-chaperon moléculaire de la protéine HSP90 identifié en 2005 (Zhao et al., 2005). Ensemble, ils participent à l'assemblage de complexes macromoléculaires tels que l'ARN polymérase II, les snRNP U4 et U5, ou encore les snoRNP. Ce complexe est composé de 4 protéines : deux AAA + ATPases, RUVBL1 et RUVBL2, et un hétérodimère formé de PIH1D1 et RPAP3. La protéine RPAP3 est composée de deux domaines TPR impliqués dans la liaison au chaperon HSP90 (Back et al., 2013; Pal et al., 2014), et de domaines N-terminal et C-terminal : lorsque j'ai débuté ma thèse, les fonctions et les structures de ces deux domaines étaient inconnus aussi. PIH1D1 lie RPAP3 et RUVBL1/2 grâce à son domaine CS C-terminal (Hořejší et al., 2014). Son domaine N-terminal, appelé domaine PIH, est nécessaire au recrutement de certains substrats, notamment grâce à une poche de reconnaissance des phosphopeptides de type DSDD/E, comme c'est par exemple le cas pour TELO2 (l'adaptateur des PIKK).

Les protéines RUVBL1 et 2 forment des hétéro-hexamères et des hétéro-dodécamères, et il semble que leur conformation ainsi que la liaison à leurs partenaires dépendent du nucléotide lié (ATP, ADP ou Apo). Ce sont cependant des protéines difficiles à manipuler *in vitro*. Ainsi leur structure reste controversée et leur fonction exacte est source de questions. Elles ne sont pas spécifiques du R2TP, car elles sont aussi présentes dans des complexes remodelateurs de la chromatine tels qu'INO80 ou SWR-C.

Dans le génome humain, deux autres protéines possèdent un domaine annoté comme étant structurellement apparenté au domaine C-terminal de RPAP3 (RPAP3 C-ter like domaine): SPAG1 (SPerm AntiGene 1) et CCDC103 (Coiled-Coil Domain Containing protein 103). De plus, SPAG1 comporte trois domaines TPR en aval de son domaine RPAP3-Cter like, cette organisation rappelle celle de RPAP3 (Figure 4A du papier joint). D'autre part, trois protéines humaines comportent un domaine PIH, en plus PIH1D1 lui-même: PIH1D2, PIH1D3 et DNAAF2/Kintoun. Chacune de ces protéines présente également un motif CS en C-terminal, selon une architecture qui ressemble beaucoup à celle de PIH1D1 (Figure 4A du manuscrit joint). Toutes ces protéines (à part PIH1D2 pour laquelle il n'existe pas de donnée publiée) sont impliquées dans des pathologies liées à un défaut de ciliogénèse, et plus particulièrement dans la formation des dynéines axonémales de cils motiles (Dong et al., 2014; Knowles et al., 2013; Omran et al., 2008; Panizzi et al., 2012; Tarkar et al., 2013). Les dynéines sont de gros complexes protéiques contenant de nombreuses sous-unités. Les cils immobiles (cils primaires)

contiennent la dynéine 2 pour le transport rétrograde, tandis que les cils mobiles contiennent des dynéines spécifiques, appelées axonémales. Ces dynéines sont en général spécifiques de types cellulaires précis (comme les cellules de l'épithélium pulmonaire ou les spermatozoïdes), car elles déterminent les propriétés physiques des cils (vitesse de battements, onde de battement, etc...). L'incorporation des dynéines nécessite des facteurs d'assemblage spécifiques (Omran et al., 2008). Nous postulons que certains facteurs seraient organisés en complexes sur le modèle du R2TP : une protéine à domaine RPAP3-Cter like, une protéine PIH et les ATPases RUVBL1 et 2. Ces complexes assembleraient les dynéines dans le cytoplasme avant qu'elles ne migrent vers les cils, comme cela a été montré pour Kintoun/DNAAF2 (Omran et al., 2008) (Figure 23).

2. Résultats

Mon travail a contribué à l'élaboration des figures : 2A, S2A, 3A, S3C, 4B, S4A-B, 5B, S5 et 6A du manuscrit suivant. Les figures 4B et S4A-B ont été réalisées avec Edouard Bertrand. Pour la figure 6A, j'ai réalisé les clonages nécessaires pour le crible double hybride.

- **Le domaine C-terminal de RPAP3 sert au recrutement des RUVBL1/2 ainsi que de nombreux clients du R2TP**

Nous nous sommes intéressés au domaine C-terminal de RPAP3. La structure en trois dimensions de ce domaine a été résolue par la technique de RMN par nos collaborateurs de l'IMoPA à Nancy (Figure 1 et S1 du papier joint). En parallèle, avec l'aide de Céline Verheggen (chercheur dans notre équipe), j'ai réalisé des expériences de protéomique afin de déterminer les partenaires de ce domaine. Pour cela, j'ai d'abord construit des lignées de cellules HeLa exprimant de façon stable le domaine C-terminal de RPAP3 couplé à la GFP, grâce un vecteur d'expression « pcDNA5-3xFlag-GFP-RPAP3cter ». Ces lignées ont été générées selon la technique du Flp-in: nous disposons de lignées de cellules HeLa modifiées où les constructions sont intégrées de façon stable à un site de recombinaison génomique « Flp Recombination Target » (FRT) reconnu par la Flipase. Ainsi le vecteur d'expression est inséré au site FRT, la protéine est exprimée fusionnée à la GFP. Après sélection de clones stables, j'ai procédé à l'analyse des interactants de RPAP3-Cter par immunoprécipitation couplée à de la spectroscopie de masse quantitative de type SILAC. Cette méthode nous permet de comparer l'enrichissement des protéines, par rapport à une immunoprécipitation contrôle, réalisée sur des extraits ne contenant pas la protéine étiquetée. Pour chaque condition, nous utilisons un milieu de culture différent. La condition contrôle est la lignée cellulaire parentale, c'est-à-dire la lignée de cellules HeLa FRT. Cette condition est cultivée dans un milieu dit « léger/light » car les acides aminés

utilisés sont normaux. Les autres conditions sont appelées « medium/ intermédiaire » et « heavy/lourd » car les acides aminés utilisés sont marqués avec des isotopes non-radioactifs (« froids ») mais plus ou moins lourds, discriminés lors de l'analyse des peptides par le spectrophotomètre. Ici, la lignée RPAP3-Cter a été cultivée en milieu intermédiaire. Les chromatographies d'affinité de la GFP sont réalisées pour chaque condition séparément, puis regroupées enfin de protocole. Grâce aux différents marquages, on peut distinguer les protéines issues de chaque culture et calculer un « ratio SILAC ». Ce ratio SILAC correspond à l'enrichissement d'une protéine dans la condition medium, par exemple, rapporté à la condition contrôle : cela indique la spécificité de l'interaction d'une proie avec l'appât. L'autre paramètre que l'on prend en compte est l'abondance de la protéine enrichie (en fonction du nombre de peptides détectés). Si la protéine est très abondante, cela renforce la probabilité de l'interaction. Les résultats de la protéomique du domaine C-terminal de RPAP3 révèlent son aptitude à lier les protéines RUVBL1 et 2, mais aussi de nombreux clients du R2TP : la grande sous-unité de l'ARN polymérase II, SHQ1 et NOP58 impliqués dans l'assemblage des snoRNP H/ACA et C/D, respectivement (cf. introduction), PRPF8 qui fait partie de la particule snRNP U5. On trouve également des protéines qui sont très probablement des adaptateurs (C12ORF45, C2ORF44, ZNHIT2).

Ces résultats SILAC suggèrent que l'une des fonctions de ce domaine RPAP3-Cter serait de permettre l'accrochage des RUVBL1/2 pour former le R2TP. Afin de confirmer cette hypothèse et de déterminer quelles protéines sont en interaction directe avec le RPAP3-Cter, j'ai réalisé un petit crible double-hybride en testant une série d'interactions deux à deux (Figure S2A du papier joint). J'ai pu montrer que seul RUVBL2 interagit avec RPAP3-Cter par cette technique. Nos collaborateurs ont ensuite réalisé des expériences de RMN et de BIACORE avec des protéines recombinantes pour tester la liaison des RUVBL1 et 2. Ces expériences montrent que le RPAP3-Cter lie directement RUVBL1 et 2 *in vitro* (Figure 2B et 2C du papier joint). Cette interaction n'a lieu qu'avec les protéines sous forme multimérique (données non montrées) et elle n'est pas influencée par la présence d'ATP (Table 1, Figure S2D).

En parallèle, nous avons analysé la contribution de la liaison à l'ATP par une expérience d'IP LUMIER du domaine Cter contre 3 mutants connus des RUVBLs. Pour les IP LUMIER, nous utilisons des vecteurs d'expression où les protéines d'intérêt sont soit fusionnées avec la luciférase Firefly (FFL) portant une étiquette « 3xFLAG » (appât), soit fusionnées à la Renilla luciférase (RL) (proie). Ici, le RPAP3 -Cter est fusionné à la 3xFLAG-FFL et les RUVBL à la RL. Nous effectuons ensuite une transfection transitoire avec les deux vecteurs dans des cellules HEK293, afin de sur-exprimer les protéines d'intérêt. 48h après la transfection, nous procédons à l'extraction des protéines et à une immunoprécipitation de l'étiquette FLAG. Cela nous permet de précipiter la protéine fusionnée à la FFL (ici le domaine RPAP3-Cter), ainsi que la protéine

fusionnée à la RL si elle interagit avec le RPAP3-Cter. Grâce à l'ajout de leurs substrats respectifs, nous pouvons ensuite activer tour à tour les deux luciférase et mesurer la luminescence qu'elles produisent. La mesure de la luminescence dans l'immunoprécipitât reflète la quantité des protéines immunoprécipitées. Cette expérience est réalisée en plaque de 96 puits, ainsi pour chaque point, un puits contiendra l'extrait brut (INPUT), le suivant sera incubé avec des anticorps anti-FLAG pour réaliser l'IP (IP) et le dernier subira une manipulation identique mais réalisée sans anticorps pour servir de contrôle dans l'expérience (Ct). Pour l'analyse, nous réalisons d'abord les ratios des coups mesurés dans l'IP rapporté à l'INPUT pour chacune des deux luciférase (IP/INPUT). Puis la valeur pour la RL (la protéine proie) est rapportée à celle de la FFL (la protéine appât). Ce ratio représente l'efficacité finale de l'IP, soit l'efficacité de l'IP de la proie fusionnée à la RL, ramenée à l'efficacité de l'IP de l'appât (en général autour de 30%-50%). Le premier mutant des RUVBL que nous avons utilisé est un mutant qui ne lie pas les nucléotides (K en M dans le motif Walker A), le second ne peut hydrolyser l'ATP mais le lie (E en Q dans le motif Walker B,) et le dernier est bloqué dans la transmission du signal conformationnel entre les sous-unités de l'hexamère (mutation du "doigt arginine"). Les résultats indiquent que l'interaction est beaucoup moins forte avec mutant qui n'est pas capable d'hydrolyser l'ATP (E->Q; Figure S2D du papier joint). La protéine RPAP3 se lierait donc aux RUVBL soit sous forme Apo (sans nucléotides), soit après l'hydrolyse de l'ATP.

- **Le domaine RPAP3-Cter lie des clients grâce aux par les protéines RUVBL1/2**

Les données sur la structure du RPAP3-Cter ont permis de proposer une série d'acides aminés potentiellement impliqués dans le recrutement de RUVBL1 et 2, et j'ai testé l'ensemble de ces résidus par double hybride. J'ai effectué une mutagenèse ciblée du domaine C-terminal basée sur la structure 3D de ce domaine. Puis, j'ai testé les interactions de chacun de ces mutants avec les protéines RUVBL1 et 2. Dans le cas précis, j'ai pu vérifier que l'interaction ainsi détectée entre le domaine C terminal de RPAP3 et RUVBL2 était spécifiquement abolie par les mutations R623A-M626A (Mutant 1) et F630A-S632A de RPAP3 (Mutant 2; Figure 3A du papier joint). Ces résultats ont été confirmés par la technique d'immunoprécipitation quantitative LUMIER. Dans ce cas, alors qu'environ 12% des protéines RUVBL1 et 5% des protéines RUVBL2 sont co-immuno-précipitées avec le domaine RPAP3-Cter, cette valeur tombe à des niveaux négligeables pour les mutants 1 et 2 (Figure 3C). Ces données confirment que les acides aminés R623/M626 et F630/S632 sont nécessaires au recrutement de RUVBL1/2.

J'ai alors répété l'étude protéomique, en utilisant cette fois les mutants 1 et 2 du domaine RPAP3-Cter, en comparaison avec le domaine sauvage. Chez les mutants (Figure 3D et S3D du papier joint), les interactions avec les partenaires précédemment identifiés sont toutes perdues sauf celle avec SHQ1 qui persiste mais qui est nettement plus faible. Ces données confirment

que R623/M626 et F630/S632 sont nécessaires au recrutement des RUVBL1/2. De plus, ils montrent que l'interaction entre RPAP3 et ces substrats dépend des RUVBL1/2. Vraisemblablement, RUVBL1/2 auraient une fonction de recrutement des substrats sur le R2TP.

- **Analyse des complexes R2TP-like dans l'organisme**

L'hypothèse de l'existence d'autres R2TP-like est renforcée grâce aux études des protéines PIH-like et RPAP3-like. Précédemment, une étude avait en effet montré que DNAAF2 interagissait avec la protéine DYX1C1 pour permettre l'incorporation de dynéines dans le cil, avec l'aide de HSP70 (Tarkar et al., 2013). DYX1C1 ne comporte pas de domaine RPAP3-Cter like mais un domaine CS (comme PIH1D1) et un domaine TPR (comme RPAP3; Figure 4A du manuscrit joint). De plus, l'analyse des banques de données révèle l'existence de plusieurs isoformes de DYX1C1 différant par le motif en aval du domaine TPR. Dans le cytoplasme, DYX1C1 recrute le chaperon HSP70 par ses domaines TPR pour l'adresser à DNAAF2 afin d'assembler les dynéines. Ce modèle rappelle celui du R2TP.

SPAG1 et CCDC103 possèdent un domaine C-ter similaire à celui de RPAP3. L'étude par RMN de ces domaines confirme qu'ils se structurent comme le RPAP3-Cter (données non montrées), et l'analyse des séquences montre que les acides aminés identifiés précédemment dans l'interaction avec les RUVBL1/2 sont partiellement conservés.

Afin de valider l'existence de complexes R2TP-like, j'ai d'abord procédé à des études systématiques d'interaction entre protéines PIH-like et RPAP3-like avec le test LUMIER (Figure 4B dans le manuscrit joint). Dans ces expériences, j'ai également inclus les différents isoformes de DYX1C1, qui diffèrent par leur région C-terminal et le dernier motif du domaine TPR. Ces expériences permettent de proposer l'existence de plusieurs nouvelles paires PIH-like/RPAP3-like: SPAG1-PIH1D2; SPAG1-DNAAF2; ainsi DNAAF2-DYX1C1 isoforme «a»; et PIH1D3-DYX1C1 isoforme "c". Les paires contenant DYX1C1 avaient déjà été mises en évidence (Olcese et al., 2017; Omran et al., 2008; Tarkar et al., 2013) mais pas le fait qu'elles soient spécifiques d'isoformes de DYX1C1. Chez *S. cerevisiae*, Pih1 reconnaît le motif en aval du dernier TPR de Tah1 (Back et al., 2013). Il semble que le motif placé après le TPR de DYX1C1 soit également responsable de l'interaction avec ses partenaires PIH-like. Je n'ai pu identifier aucun partenaire pour CCDC103.

- **Un nouveau complexe d'assemblage, le R2SP (RUVBL1/2, SPAG1, PIH1D2)**

SPAG1 possède un domaine RPAP3-Cter-like susceptible de lier les RUVBL. Les données ci-dessus suggèrent que cette protéine pourrait former deux complexes R2TP-like, l'un avec DNAAF2, et l'autre avec PIH1D2.

J'ai donc procédé à des expériences de protéomique quantitative SILAC pour tester cette hypothèse. Pour obtenir une vision large des protéines RPAP3-like et PIH-like, j'ai utilisé plusieurs protéines comme appâts: PIH1D2, PIH1D3, DNAAF2 et CCDC103. Comme

précédemment, le modèle consistait à insérer de façon stable un plasmide codant pour la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP dans le génome de cellules HeLa, afin d'obtenir des cellules qui sur-expriment cette protéine. Il faut cependant noter que les cellules HeLa sont dépourvues de cils, et qu'elles n'expriment pas toutes les molécules qui nous intéressent: notamment PIH1D2, CCDC103 et PIH1D3 semblent absentes (d'après nos données de transcriptomique). Il peut donc y avoir un biais, et des interactions peuvent être manquées ou favorisées. Les résultats des IP SILAC que j'ai réalisées sont présentés dans la Figure 5B du manuscrit joint. Ces résultats confirment l'existence d'un complexe entre SPAG1, PIH1D2 et les RUVBL. Par analogie avec le R2TP, nous avons nommé ce complexe le R2SP.

En revanche, je n'ai pas pu mettre en évidence de complexe entre DNAAF2 et SPAG1: DNAAF2 est détecté uniquement en liaison avec l'isoforme "a" de DYX1C1, et ce complexe ne semble pas s'associer avec les RUVBL, comment prédit par l'absence de domaine RPAP3-Cter like dans DYX1C1. Enfin la protéomique de CCDC103 ne permet d'identifier aucun candidat, et nous ne détectons pas d'interaction significative avec les RUVBL. PIH1D3 interagit fortement avec une protéine appelée LRIF1, mais nous ne détectons pas DYX1C1 comme attendu. PIH1D3 ne semble pas non plus s'associer avec les RUVBL.

- **Mise en évidence de substrats potentiels du complexe R2SP : la Liprine $\alpha 2$**

Par des tests LUMIER, j'ai mis en évidence une interaction entre SPAG1 et la protéine PIH1D2 (Figure 4B du manuscrit joint). SPAG1 possède un domaine C-ter similaire à RPAP3 et elle interagit avec RUVBL1 et 2 (Figure 4C). De plus, cette interaction est renforcée en présence de Pih1D2 (Figure 5A), ce qui suggère que Pih1D2 participe à la liaison aux ATPases – directement ou non. Par des expériences de protéomique SILAC, j'ai confirmé l'existence du complexe R2SP, et j'ai montré que ce complexe s'associe aussi à la protéine chaperon HSP70. (Figure 4B) SPAG1 contient lui aussi des domaines TPR, et, dans son cas, ces domaines pourraient être impliqués dans la liaison à HSP70.

Pour aller plus loin, j'ai cloné les cDNAs de PIH1D2 et SPAG1 dans des vecteurs permettant la réalisation de cribles double-hybride par la société Hybrigenics. Ces cribles ont été réalisés sur des banques de testicules et de lignées cellulaires cancéreuses de poumon. Ceci nous a permis d'identifier des substrats potentiels de ce nouveau complexe (Figure 6A). Parmi ces protéines se trouvent des molécules impliquées dans différents processus cellulaires comme la transcription ou l'organisation du cytosquelette. Ces interactions ont été confirmées par IP LUMIER (Figure 6B). Afin de déterminer si ces interactions ont une signification fonctionnelle, Céline Verheggen a réalisé une étude comparative du niveau d'expression des substrats potentiels entre des cellules HeLa et des cellules HeLa où Pih1D2 est surexprimé

(HeLa-PIH1D2-GFP). Ceci a permis de montrer que la présence de PIH1D2 facilitait l'expression de certaines de ces protéines (Figure 7A). Nous avons sélectionné la Liprine α 2 comme modèle d'étude d'un substrat du R2SP car elle fait partie des protéines candidates les plus dépendantes de PIH1D2.

- **Le R2SP semble être un complexe d'assemblage spécifique d'un tissu.**

Certains des substrats identifiés sont enrichis dans les testicules, ce qui suggère une fonction spécifique du R2SP dans ce tissu : en effet, le flagelle des spermatoocytes n'est autre qu'un cil motile spécialisé. La même expérience qu'au paragraphe précédent a été réitérée à 37°C (conditions de culture classique) et à 32°C, plus proche de la température des testicules. La stabilisation des substrats candidats du R2SP (mais pas des substrats du R2TP) est plus prononcée lorsque les cellules sont cultivées à 32°C qu'à 37°C, suggérant une dépendance accrue à PIH1D2, et donc potentiellement au R2SP à 32°C (Figure 7B).

- **Le R2SP favorise l'assemblage de la Liprine α 2 avec ses partenaires**

Pour vérifier le rôle de R2SP dans l'assemblage de ses substrats, nous nous sommes focalisés sur la liprine α 2. Les Liprines sont impliquées dans le contrôle de la migration cellulaire et de l'organisation des synapses. La liprine α 2 forme des hétéro-dimères avec les Liprines α 1 et α 3, et s'associe également avec les protéines Liprine β 2, CAST, GIT1 KIF1A et RIMS1 (les protéines partenaires de la liprine α 2). Ensemble, elles forment un complexe qui est présent notamment dans le cerveau. Pour tester un rôle éventuel du R2SP dans le recrutement des protéines partenaires de la Liprine α 2, une étude de co immunoprécipitation (IPLUMIER) a été réalisée. Ces expériences montrent que la sous-unité SPAG1 du R2SP lie plusieurs partenaires de la Liprine α 2. Ensuite, nous avons voulu tester si le complexe R2SP facilite l'association de la Liprine α 2 avec ses partenaires. Pour cela, des IP LUMIER ont été faites dans des cellules HeLa et HeLa-PIH1D2. L'association de la liprine α 2 avec ses protéines cibles est favorisée par la présence de PIH1D2, vraisemblablement dans le contexte du R2SP. Le R2SP favoriserait donc la formation de la structure quaternaire de la Liprine α 2. Nous avons donc montré l'existence d'un nouveau complexe modulateur de l'assemblage de complexes, mais cette fois spécifique d'un tissu particulier.

The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones

Chloé Maurizy^{1,2,+}, Marc Quinternet^{3,+}, Yoann Abel^{1,2}, Céline Verheggen^{1,2}, Paulo E. Santo⁴,
Maxime Bourguet⁵, Ana C. F. Paiva⁴, Benoît Bragantini⁶, Marie-Eve Chagot⁶, Marie-Cécile
Robert^{1,2}, Claire Abeza^{1,2}, Philippe Fabre⁶, Philippe Fort⁷, Franck Vandermoere⁸, Pedro M.F.
Sousa⁴, Jean-Christophe Rain⁹, Bruno Charpentier⁶, Sarah Cianférani⁵, Tiago M. Bandejas⁴,
Bérengère Pradet-Balade⁷, Xavier Manival^{6,*}, Edouard Bertrand^{1,2,*,§}

+: equal contribution

*: to whom correspondence should be addressed

§: lead contact

1-IGMM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

2-Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer

3-Ingénierie-Biologie-Santé Lorraine (IBSLor), UMS 2008 CNRS INSERM Université de
Lorraine, Biopôle, Campus Biologie Santé, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

4-Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa,
Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal and iBET, Instituto de Biologia Experimental e
Tecnológica, Apartado 12, 2780-901 Oeiras, Portugal

5-Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS,
IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

6-Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS-
Université de Lorraine, Biopôle, Campus Biologie-Santé, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP
20199, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

7-CRBM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

25 8- IGF, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

26 9-Hybrigenics Services, Paris France

27 Keywords: Assembly of macromolecular complexes, chaperone, HSP90/R2TP, RUVBL

28 ATPase, Pontin/Reptin, tissue proteostasis

29 Running title: R2SP is a tissue-specific quaternary chaperone

30

31

32 **Summary**

33 R2TP is an HSP90 co-chaperone that assembles important macro-molecular machineries. It is
34 composed of an RPAP3-PIH1D1 heterodimer, which binds the two essential AAA+ ATPases
35 RUVBL1/RUVBL2. Here, we resolved the structure of the conserved C-terminal domain of
36 RPAP3, and we show that it directly binds RUVBL1/RUVBL2 hexamers. The human
37 genome encodes two other proteins bearing RPAP3-C-terminal-like domains and three
38 containing PIH-like domains. Systematic interaction analyses show that one RPAP3-like
39 protein, SPAG1, binds PIH1D2 and RUVBL1/2 to form an R2TP-like complex termed R2SP.
40 This co-chaperone is enriched in testis and among 68 of the potential clients identified, some
41 are expressed in testis and others are ubiquitous. One substrate is liprin- α 2, which organizes
42 large signalling complexes. Remarkably, R2SP is required for liprin- α 2 expression and for
43 the assembly of liprin- α 2 complexes, indicating that R2SP functions in quaternary protein
44 folding. Effects are stronger at 32°C, suggesting that it may help compensating the lower
45 temperature of testis.

46

47 The R2TP complex was discovered in *S. cerevisiae* as an HSP90 co-factor ¹. R2TP is an
48 unusual co-chaperone because it appears specialized in quaternary protein folding, and in
49 particular in the assembly of key cellular machineries important for cell growth ². The first
50 and best-documented R2TP clients are the small nucleolar ribonucleoprotein particles
51 (snoRNPs), which are required for the maturation of ribosomal RNAs ³. More recently, other
52 substrates were described, including the U4 and U5 spliceosomal snRNAs ^{4, 5, 6}, the nuclear
53 RNA polymerases ^{7, 8, 9}, and the family of PI3K-like kinases (PIKKs), which comprises
54 mTOR, DNA-PK, ATR, ATM, SMG1 and TRRAP ^{10, 11, 12}. Given the role of these clients in
55 cell growth and proliferation, it was hypothesized that R2TP mediates some of the
56 tumorigenic effects elicited by HSP90 ¹³. Newly identified clients involved in DNA damage
57 response corroborate this possibility ¹⁴.

58 In humans, R2TP is composed of a core that associates with prefoldins and additional
59 factors to form the R2TP/Prefoldin-like complex, recently renamed PAQosome ^{7, 8, 9, 15}. The
60 R2TP core is composed of four subunits (Figure 1A): PIH1D1, RPAP3, and the two related
61 AAA+ ATPases RUVBL1 and RUVBL2 (also called Pontin and Reptin). RPAP3 directly
62 binds HSP90 and forms a stable heterodimer with PIH1D1 ^{16, 17}. These components are
63 believed to function as adaptor and regulatory factors while RUVBL1 and RUVBL2 are the
64 catalytic components that likely possess a chaperone activity ¹⁸. The analysis of snoRNP
65 biogenesis suggests that R2TP functions through a stepwise process, where HSP90 stabilizes
66 clients before their assembly, followed by the independent recruitment of several snoRNP
67 components by R2TP, and ending in the loading of RUVBL1/2 on the client complex ¹⁹. The
68 precise molecular role of RUVBL1 and RUVBL2 still remains elusive. Structural studies
69 showed that they form a hexameric ring typical for this class of enzymes ²⁰. Additionally, they
70 contain an insertion called domain II, which protrudes from the ATPase ring and forms a
71 flexible structure whose conformation depends on the presence and nature of bound

72 nucleotides ^{21,22}. RUVBL1/2 have been shown to make ATP-dependent contacts with some
73 cofactors and client proteins ^{23,24}, suggesting that ATP loading and hydrolysis may act as a
74 switch to control the binding and release of clients. Accordingly, it has been proposed that
75 RUVBL1/2 stabilize interactions between subunits of target complexes ¹⁹, or, alternatively,
76 that they stimulate the dissociation of specific assembly factors ²⁵. Recent structural analyses
77 showed that RUVBL1/2 cycle between hexameric and dodecameric forms, with client binding
78 promoting dimerization of the hexamer, and ATP hydrolysis dissociation of the dodecamer ¹⁸.
79 This provides a first glimpse of how these fascinating enzymes may chaperone their clients.

80 Structural studies revealed that PIH1D1 has two domains. Its N-terminal region
81 harbors the conserved PIH domain that possesses a phospho-peptide binding pocket
82 responsible for the recognition of some substrates ^{16,17}. Its C-terminal region folds as a CS
83 domain and mediates hetero-dimerization with RPAP3 ^{16,17,26}. RPAP3 has a C-terminal
84 domain of unknown function (RPAP3-Cter), and a middle region composed of six
85 tetratricopeptide repeats (TPR) arranged in two consecutive domains (Figure 1B). Structural
86 studies showed that they bind HSP90 through five conserved residues forming a carboxylate
87 clamp, which catches the last C-terminal residues of the chaperone (-MEEVD; ^{17,27}). A recent
88 cryo-EM structure of the yeast R2TP revealed that a single copy of the Tap1p:Pih1p dimer
89 binds an hetero-hexamer of Rvb1/2p (the yeast homologs of RPAP3, PIH1D1 and RUVBL1/2,
90 respectively ^{28,29}). This interaction involves the DII domain of the ATPases and the linker
91 separating the PIH and CS domains of Pih1p ^{28,29,30}.

92 In this study, we elucidated the 3D structure of the RPAP3 C-terminal domain. We
93 show that this highly conserved domain binds directly the RUVBL1/2 ATPases. A similar
94 domain is also present in a human protein called SPAG1, and we demonstrate that it forms an
95 R2TP-like complex that functions in quaternary protein folding.

96

97 **Results**

98 *The RPAP3 C-terminal domain is ancient and co-evolved with PIH-domain proteins*

99 While extensive structural studies have been performed with R2TP proteins ¹⁵, the structure
100 and function of RPAP3-Cter is unknown. This domain is absent in the *S. cerevisiae* homolog
101 of RPAP3, and to clarify the links between this domain and R2TP, we first performed an
102 evolutionary analysis (Figure 1C). In addition to RPAP3, the human genome encodes two
103 other proteins harboring a RPAP3-Cter-like domain: SPAG1, which also contains three TPR
104 domains, and CCDC103, which has a N-terminal dynein attachment domain. Remarkably,
105 proteins with both an RPAP3-Cter and a TPR domain occur in all eukaryotic lineages (Figure
106 1C; blue dots in the “RPAP3_C” column). A single such protein was likely present at the root
107 of the tree, and a duplication event having probably occurred between Amoebozoa and
108 Opisthokonta (Fungi and Metazoa) generated RPAP3 and SPAG1. Concerning proteins with
109 PIH domain, the human genome encodes three such proteins besides PIH1D1: PIH1D2,
110 PIH1D3 and DNAAF2 (also known as Kintoun). DNAAF2 is known to associate with
111 DYX1C1 ³¹, a CS- and TPR- containing protein that we included in our analysis. Most of the
112 eukaryotic lineages encode three PIH-proteins and one DYXC1 ortholog. These proteins are
113 present in all eukaryotic branches and thus of ancient origin, as previously noted ³².
114 Interestingly, the duplication of the RPAP3 ancestor is mimicked by a similar contemporary
115 duplication of the ancestor of PIH1D1, which generated PIH1D1 and PIH1D2. This appears
116 specific for these genes, because RUVBL1/2, as well as other HSP90 co-chaperone were not
117 duplicated (Figure 1C and data not shown). Together, this analysis indicates that the ancestral
118 form of RPAP3 had both TPR and RPAP3-Cter domains, suggesting an important function
119 for this domain. This protein further co-evolved with the ancestor of PIH1D1, pointing to a
120 link with R2TP.

121

122 *The NMR structure of RPAP3-Cter reveals a new 3D fold*

123 In order to get more information on RPAP3-Cter, we performed structural studies. After
124 sequence analysis, we expressed fragments 535-665 and 547-665 of human RPAP3. Only the
125 largest domain, *i.e.* RPAP3₅₃₅₋₆₆₅, showed a high stability and solubility after expression and
126 purification from *E. coli* (Figure S1A-B). Using NMR, intensity and distribution of peaks in
127 the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum revealed a properly folded domain (Figure S1C). We obtained a
128 well-resolved set of 20 water-refined structures (Table S1), showing that this domain is
129 composed of 8 α -helices that pack together to form a globular object (Figure 1D-F).
130 Interestingly, the N-terminal residues 541-548 form a loop that protects several hydrophobic
131 amino-acids from solvent, including Leu542, Pro543, Ile545 and Pro546 (Figure S1D). This
132 loop contributes to the solubility of RPAP3-Cter since its truncation in RPAP3₅₄₇₋₆₆₅ leads to
133 protein aggregation (data not shown). We submitted our structure to the DALI server to
134 search for potential structural homologs. No strong candidate could be identified using a top
135 DALI Z-score below 8, with a mean RMSD and identity percentage of 3.6 Å and 9.7%,
136 respectively. We concluded that RPAP3-Cter adopts a new 3D fold, which could thus
137 possibly be linked to a new biological function.

138

139 *RPAP3-Cter associates with RUVBL1/2 and with some R2TP clients*

140 To get insights into the function of RPAP3-Cter, we characterized its partners by performing
141 a proteomic analysis in human cells. We fused this domain to GFP and stably expressed it in
142 HeLa cells using site-specific integration with the Flp-In system. Following differential
143 labeling of GFP-RPAP3-Cter and control cells with isotopic amino-acids (SILAC), whole cell
144 extracts were immuno-precipitated (IP) with anti-GFP antibodies and pellets were subjected
145 to quantitative mass-spectrometry analysis (Figure 2A). About 20 proteins associated with
146 RPAP3-Cter with high abundance (intensity) and specificity (SILAC ratio). The top hits were

147 RUVBL1/2, while the others belonged to several classes: (i) known R2TP clients (SHQ1 and
148 NOP58 for snoRNPs, PRPF8 and other U5 proteins for snRNAs, POLR2A for RNA
149 polymerase II); (ii) known R2TP cofactors (ZNHIT2) and/or RUVBL1/2 partners
150 (C12ORF45, C2ORF44, DPCD)^{6, 19, 23}; (iii) PAQosome subunit (PFDN2)²; and (iv)
151 chaperones (HSP70 isoforms and its regulator BAG2). Overall, these data suggest that
152 RPAP3-Cter may play an important role in interacting with RUVBL1/2 and with R2TP
153 clients.

154

155 *RPAP3-Cter directly binds RUVBL1/2*

156 We then performed pairwise yeast two-hybrid assays (Y2H) between RPAP3-Cter and its
157 putative partners (Figure S2A). We detected a positive signal with RUVBL2, but not with the
158 other tested proteins. To determine whether this interaction is direct, we used recombinant
159 proteins for in vitro binding assays. RUVBL1/2 were co-expressed in *E. coli* and they purified
160 predominantly as a dodecamer (see below). We then assessed the binding to RPAP3-Cter
161 using NMR spectroscopy. We took advantage of the ¹³C-labeling to monitor the effect of
162 RUVBL1/2 on the methyl groups of RPAP3-Cter. Indeed, methyl groups are adapted to probe
163 interactions, due to their ability to provide strong signals even at low protein concentrations
164 and/or at basic pHs³³. The NMR signal of the ¹³C-labeled RPAP3-Cter decreased
165 dramatically in presence of the RUVBL1/2 hetero-multimers (Figure 2B), while only minor
166 effects were seen with RUVBL1 or RUVBL2 alone (Figure S2B). This demonstrated that
167 RPAP3-Cter bound heteromeric forms of RUVBL1/2.

168 RUVBL1/2 have been recently shown to cycle between hetero-hexamers and hetero-
169 dodecamers²², and we thus wished to determine the stoichiometry of the interaction. First we
170 co-expressed RPAP3-Cter with RUVBL1/2 in *E. coli*, and analyzed the complex by gel-
171 filtration (Figure 2D-E). The eluting volumes of RUVBL1/2 alone and RUVBL1/2:RPAP3-
172 Cter corresponded to molecular masses of dodecameric and hexameric forms of RUVBL1/2,

173 respectively. Next, we performed mass spectrometry analysis under non-denaturing
174 conditions (native MS), of either RUVBL1/2 alone, or RUVBL1/2 mixed with recombinant
175 RPAP3-Cter (Figure 2F). In the free state, RUVBL1/2 formed hetero-hexameric and hetero-
176 dodecameric complexes, but hexameric forms became largely dominant upon RPAP3-Cter
177 binding. Note also that one hexamer can bind multiple RPAP3-Cter domains. These data thus
178 demonstrate that RPAP3-Cter binds predominantly RUVBL1/2 hetero-hexamers.

179 Next, we analyzed the binding of RPAP3-Cter to RUVBL mutants altered in their
180 ATPase cycle. For this, we turned to LUMIER interaction experiments. This is a quantitative
181 co-IP assay where the prey and bait proteins are respectively fused to Renilla luciferase (RL)
182 and FLAG-tagged Firefly luciferase (3xFLAG-FFL). Following transient expression in
183 human HEK293 cells, the bait is IP'ed with anti-FLAG antibodies, or without antibodies as
184 control. The RL and FFL luciferase activities are then measured in the input and pellet, and
185 the co-IP efficiency is expressed as the percent of prey co-immuno-precipitated, relative to
186 that of the bait, providing a direct measurement of binding efficiencies (Figure S2D). In these
187 experiments, we used canonical mutations of AAA+ ATPases³⁴, expected to prevent
188 nucleotide binding (K to M mutant in the Walker A domain), nucleotide hydrolysis (E to Q in
189 the Walker B domain), or coupling between adjacent monomers (R to E in the "Arg finger").
190 Note that the effect of several of these mutations has been previously established using the
191 *Chaetomium thermophilum* orthologs of RUVBL1 and RUVBL2²². Interestingly, while the
192 K-M and R-E mutations had little effects on the association of either RUVBL1 or RUVBL2
193 with RPAP3-Cter, the E-Q mutations strongly diminished binding (Figure S2D). Taken
194 together, these data indicated that RPAP3-Cter made a direct high affinity interaction with
195 hexameric RUVBL1/2. This interaction did not require nucleotide and was weakened in
196 mutants deficient in ATP hydrolysis.

197

198 *RPAP3-Cter mutants that do not bind RUVBL1/2 loose association to R2TP clients*

199 Our proteomic analysis of RPAP3-Cter showed that it binds not only the RUVBL1/2 ATPases,
200 but also a range of R2TP clients. In order to test whether RPAP3-Cter binds these other
201 partners independently of the RUVBL ATPases, we generated a series of RPAP3-Cter
202 mutants. Structure-guided mutations were used to select solvent-exposed residues potentially
203 involved in RUVBL1/2 interaction (Figure S3A-B). Alanine mutants were screened by Y2H
204 assays, and two of them indeed lost interaction with RUVBL2 (Figure 3A): R623A-M626A
205 (Mut1), and F630A-S632A (Mut2). Both mutants localized in the nucleoplasm and the
206 cytoplasm, and were excluded from nucleoli. This is similar to wild-type RPAP3-Cter (Figure
207 S3C), suggesting no major alteration of the mutants. The mutated residues are highly
208 conserved across evolution (Figure S3D). They were located next to each other in the 3D
209 structure of RPAP3-Cter (Figure 3B), suggesting that they may constitute a conserved binding
210 site for RUVBL1/2. To confirm the Y2H data, we performed LUMIER interaction assays,
211 which demonstrated that both RPAP3-Cter Mut1 and Mut2 lost interaction with RUVBL1 and
212 RUVBL2 (Figure 3C). Next, we performed SILAC quantitative proteomic analyses of the
213 RPAP3-Cter mutants, by fusing them to GFP and stably expressing them in HeLa cells using
214 the Flp-In system. Remarkably, both mutants lost all of the previously identified partners of
215 RPAP3-Cter (Figure 3D-E), with the exception of SHQ1, which remained weakly bound to
216 RPAP3-Cter Mut1. Taken together, these data suggest that RUVBL1/2 are required for the
217 association of RPAP3-Cter with its other partners.

218

219 *Gene paralogs and alternative splicing generate a diversity of RPAP3-like:PIH-like hetero-*
220 *dimeric complexes*

221 As described above, the human genome encodes two other proteins bearing RPAP3-Cter-like
222 domains, SPAG1 and CCDC103, and three containing PIH domains, PIH1D2, PIH1D3 and
223 DNAAF2 (Figure 1C, Figure 4A). This raised the possibility that these proteins could form

224 R2TP-like complexes, by associating to each other and with RUVBL1/2 through their
225 RPAP3-Cter-like domains. To test this possibility, we first performed systematic pairwise
226 LUMIER co-IP assays between RPAP3-like and PIH-like proteins (Figure 4B). In these tests,
227 we also added DYX1C1 because this protein associates with DNAAF2³¹, and bears some
228 structural features of RPAP3 and PIH1D1 (e.g. TPR and CS domains), although it lacks PIH
229 and RPAP3-Cter domains. We also included the known splicing isoforms of DYX1C1 and
230 RPAP3, including the RPAP3 isoform 2 that does not interact with PIH1D1³⁵. Finally, to test
231 the possible functions of these proteins as chaperone, we included HSP70, HSP90 and STIP1,
232 a factor that promotes the transfer of clients from HSP70 to HSP90³⁶. These proteins were
233 fused at their N-termini to Renilla luciferase or to 3xFLAG-Firefly luciferase. The plasmids
234 were transiently transfected in HEK293 cells, and FLAG IPs were performed (Figure 4B). As
235 above, the interaction strength was expressed as the fraction of co-IP'ed prey protein
236 normalized to that of the bait. Negative controls were done using four unrelated proteins,
237 which were tested against all the RPAP3-like and PIH-like proteins (Figure S4A). This
238 allowed us to rigorously identify specific interactions (see Methods). These experiments
239 revealed that all the TPR-containing proteins interacted with HSP70, HSP90 and STIP1,
240 although the co-IP efficiency was low (Figure 4B and S4B). This could be due to a low
241 affinity of these interactions, or to the fact that HSPs have many partners that potentially
242 compete with baits in extracts. Most interestingly, we uncovered three strong associations
243 between RPAP3-like and PIH-like proteins (30-40% of co-IP efficiencies): RPAP3-iso-1 with
244 PIH1D1, DYX1C1-iso-a with DNAAF2, and SPAG1 with PIH1D2. Two other strong
245 interactions were found, between DYX1C1-iso-c and PIH1D3, and between DNAAF2 and
246 SPAG1, although the IP efficiencies were 5-10 times less than for the previous couples (4-8%
247 of co-IP efficiencies). Finally, a number of weak but significant interactions were also found

248 (Figures 4B and S4C), suggesting that additional PIH1D1-like/RPAP3-like pairs may also
249 form, albeit at low efficiencies.

250

251 *SPAG1 binds RUVBL1/2 and this interaction is facilitated by PIH1D2*

252 We then tested whether SPAG1 and CCDC103 could bind RUVBL1/2, using LUMIER
253 assays (Figure 4C). SPAG1, RPAP3-iso-1 and iso-2 interacted with both RUVBL proteins,
254 while CCDC103 did not. Surprisingly however, the isolated C-terminal domain of SPAG1
255 failed to interact with RUVBL1 or RUVBL2. The C-terminal domains of RPAP3, SPAG1
256 and CCDC103 have an overall identity of only 25%, and the sequence differences may
257 modulate their affinity for RUVBL1/2, from a high affinity binding for RPAP3-Cter, to a low
258 or no binding for SPAG1-Cter and CCDC103-Cter. Indeed, the amino-acids required for the
259 binding of RPAP3-Cter to RUVBL1/2 are not strictly conserved in SPAG1 and CCDC103
260 (Figure S3B). Since the full-length SPAG1 protein bound better to RUVBL1/2 than the
261 isolated SPAG1-Cter domain, we further tested whether its PIH1D2 partner would enhance
262 binding. We repeated the LUMIER binding assay in presence of a co-expressed, untagged
263 PIH1D2 protein (Figure 5A). Indeed, co-expression of PIH1D2 increased the binding of
264 SPAG1 to RUVBL1 and RUVBL2 by nearly 3-fold, achieving a binding efficiency similar to
265 that of full-length RPAP3. Taken together, these data indicate that SPAG1 binds RUVBL1/2
266 and that the binding determinants likely include several regions within SPAG1 and PIH1D2.

267 This result prompted us to test whether the PIH-like proteins would interact with
268 RUVBL1/2. LUMIER assays indicated that significant interactions could be detected (Figure
269 S4C), but these interactions were however weak (5-20 fold weaker than with RPAP3).

270

271 *Human cells contain several complexes related to R2TP*

272 The LUMIER assays indicate that SPAG1 can interact with PIH1D2 and RUVBL1/2, and it
273 might thus form a complex similar to R2TP. To obtain direct evidence that this complex

274 exists, and to determine whether additional R2TP-like complexes may form, we turned to
275 quantitative SILAC proteomics. To obtain a broad view of these complexes, we fused GFP to
276 PIH1D2, PIH1D3, DNAAF2 and CCDC103, stably expressed the fusions in HeLa cells and
277 used them as baits in proteomic experiments (Figure 5B and Table S3). We did not find any
278 partner for GFP-CCDC103. For GFP-PIH1D3, we found a strong association with LRIF1, a
279 nuclear factor enriched in testis. Only minute amounts of RUVBL1/2 were detected, in
280 agreement with the weak interaction observed in the LUMIER assays. DYX1C1-iso-c was
281 also not detected, possibly because of its low abundance in HeLa cells (Gtex dataset, ³⁷). For
282 GFP-DNAAF2, we found a strong association with DYX1C1-iso-a, and again a weak binding
283 to RUVBL1 and RUVBL2 that agreed with the LUMIER assays (Figure 4B and S4C). In the
284 GFP-PIH1D2 IP, the three most prominent proteins were SPAG1, RUVBL1 and RUVBL2,
285 all found with both a high specificity and abundance (Figure 5B). HSP70 and its regulator
286 BAG2 were also significantly enriched. This indicated the existence of an R2TP-like complex
287 containing PIH1D2, SPAG1, RUVBL1/2, which associated with the HSP70 chaperone. The
288 other GFP-PIH1D2 partners found in this experiment were involved in a variety of processes,
289 ranging from metabolism to RNA processing, and may represent clients of this novel
290 chaperone system. No prefoldin nor prefoldin-like complexes were detected, but we note that
291 an interaction of SPAG1 with WDR92 has been previously described ²³.

292 Collectively, the LUMIER and proteomic data thus defines three types of complexes
293 related to R2TP (Figure 5C). A first complex is composed of RPAP3-iso-2 in association with
294 RUVBL1/2. This complex is identical to the canonical R2TP except that it lacks PIH1D1, and
295 was thus termed R2T. A second complex comprises SPAG1, PIH1D2 and RUVBL1/2. This
296 complex shares an organization similar to R2TP and was termed R2SP. Another related
297 complex could form with SPAG1, DNAAF2 and RUVBL1/2 (i.e. an R2SD complex).
298 However, this complex remains hypothetical since it was detected in the LUMIER but not in

299 the proteomic experiments. Finally, we observed two heterodimers containing a PIH-like
300 protein associated with a DYX1C1 isoform: DNAAF2/DYX1C1-iso-a and
301 PIH1D3/DYX1C1-iso-c. These interactions were previously reported ^{31, 38}, but the isoform
302 specificity of DYX1C1 was not known.

303 The occurrence and composition of these complexes is nicely corroborated by our
304 evolutionary analyses (Figure 1C). The parallel duplication leading to RPAP3 and SPAG1 on
305 one side, and PIH1D1 and PIH1D2 on the other, is consistent with their respective
306 incorporation into R2TP and R2SP. Similarly, some species contain an RPAP3 ortholog but
307 lack a PIH1D1/PIH1D2 gene, thus mirroring the existence of R2T in human cells. The
308 frequent co-occurrence of DYX1C1 with either DNAAF2 or PIH1D3 is also consistent with
309 the association observed for the human proteins.

310

311 *R2TP-related factors localize to various cellular compartments and are enriched in testis.*

312 To gain insights into the function of these R2TP-related complexes, fluorescent microscopy
313 was performed with the stable cell lines expressing the GFP-tagged proteins. The different
314 proteins localized to different cellular areas, suggestive of specialized functions (Figure S5).
315 Interestingly, DYX1C1-iso-c was nuclear and concentrated in punctate structures, as did its
316 partner PIH1D3. It is also worth noting that RPAP3-iso-2 was mainly nuclear while RPAP3-
317 iso-1 was mainly cytoplasmic. Thus, alternative splicing determines not only the partners but
318 also the localization of these proteins.

319 Next, we examined existing data to determine in which tissues these factors are
320 expressed (Gtex dataset ³⁷; Figure S6A). The expression patterns of RUVBL1, RPAP3 and
321 PIH1D1 looked similar to each other, with a rather ubiquitous expression. DNAAF2 and
322 SPAG1 were also broadly expressed, but with a moderate enrichment in testis. Interestingly,

323 PIH1D2, PIH1D3 and RUVBL2 were highly expressed in testis, suggesting an important role
324 in this organ.

325

326 *PIH1D2 has both ubiquitous and testis-enriched partners*

327 To characterize the function of R2SP, we first searched for partners by performing yeast two-
328 hybrid screens using PIH1D2 as bait. Given its expression pattern, we screened human
329 libraries from lung cancer cell lines and from testis (Figure 6A). The screens revealed a total
330 of more than 60 potential partners (46 from the lung cancer library and 32 from testis; Figure
331 6A and Table S4). Nine proteins were found in both libraries, including SPAG1, indicating
332 the high quality of the screens. These PIH1D2 partners are involved in a variety of function,
333 ranging from DNA metabolism, transcription and RNA processing, and up to cytoskeletal
334 organization, membrane-related processes and trafficking.

335 To validate these interactions, we selected 16 proteins and tested them in LUMIER
336 assays (Figure 6B). Taken together, these data demonstrated that PIH1D2 has a range of
337 partners involved in a variety of nuclear and cytoplasmic processes. Some partners were
338 enriched in testis and others were ubiquitous (Gtex dataset, ³⁷; Figure 6B).

339

340 *R2SP promotes the expression of some of its partners and their incorporation into large*
341 *molecular assemblies*

342 Next, we tested whether R2SP has any chaperone activity toward its partners. Since PIH1D2
343 is poorly expressed in HeLa cells, in contrast to the other components of R2SP (Figure S6B),
344 we generated HeLa cells that stably expresses GFP-PIH1D2, and which thus have a fully
345 assembled R2SP complex (see Figure 5B). To measure its chaperone activity, we fused to
346 Firefly luciferase the PIH1D2 partners identified previously and transiently transfected them
347 in HeLa-PIH1D2 and parental HeLa cells. Remarkably, five proteins were significantly more
348 expressed in presence of GFP-PIH1D2, reaching a threefold increase in one case (Figure 7A).

349 These were PPFIA2 (liprin- α 2), ZBTB1, TCP11, PATL1 and PIK3CB. In contrast, the
350 expression of a broad series of control proteins, including unrelated factors (Alix, FFL) or
351 known R2TP-substrates (EFTUD2, PRPF31, NOP58), was identical in both cell lines (Figure
352 7A). Next, we repeated the experiments at 32°C, the optimal temperature of testis where
353 PIH1D2 is highly expressed. We observed that the effects of R2SP were generally more
354 important at this temperature. Taken together, this suggested that R2SP enhanced expression
355 of some of its partners and had a stronger effect at the unusual temperature of testis.

356 Since R2TP is involved in the assembly of target complexes¹⁵, we hypothesized that
357 R2SP could do the same. To test this possibility, we focused on liprin- α 2 (PPFIA2). Indeed,
358 this is the strongest binder of PIH1D2, and it is also the most sensitive to the presence of
359 PIH1D2. In addition, liprins are important scaffolding molecules that bring together a diverse
360 set of factors in order to control cell adhesion, cell migration, and organization of the active
361 synaptic zone³⁹. Liprins possess a long coiled-coil domain at their N-terminus, followed by a
362 linker and three Sterile Alpha Motif domains (SAM). The coiled-coil domain of liprin- α 2 can
363 dimerize or heteromerize with liprin- α 1 and α 3⁴⁰. This domain also binds to CAST (a calpain
364 inhibitor), GIT1 (an Arf GTPase activating protein), KIF1A and RIMS1, a protein involved in
365 the docking of exocytic vesicles^{39,41}. The SAM domain of liprin- α 2 interacts with the kinase
366 CASK, as well as with the tyrosine phosphatases LAR (PTPRF), PTPRD and PTPRS⁴⁰. In
367 addition, it can simultaneously interact with liprin- β to organize higher order molecular
368 assemblies⁴¹.

369 We first determined whether R2SP could interact with the partners of liprin- α 2. We
370 fused liprin- α 1, liprin- β 2 (PPFIBP2), CASK and RIMS1 to Renilla Luciferase and to flagged
371 Firefly-Luciferase, and performed LUMIER assays with R2SP subunits (Figure 7B). Indeed,
372 CASK, liprin- β 2 and RIMS1 interacted with SPAG1. Next, we tested whether R2SP would
373 facilitate the association of liprin- α 2 with its partners. FLAG-FFL-liprin- α 2 was transfected

374 in HeLa and HeLa-PIH1D2 cells, and LUMIER IPs were performed with RL-tagged liprin- α 2
375 partners. Of note, a larger amount of the FLAG-tagged liprin- α 2 plasmid was transfected in
376 HeLa cells to compensate for its lower level of expression in this cell line, such that a similar
377 ratio of bait over preys was obtained in HeLa and HeLa-PIH1D2 cells (data not shown). The
378 efficiency of co-precipitation of liprin- α 1 by liprin- α 2 was similar in HeLa and HeLa-
379 PIH1D2 cells. In contrast, liprin- β 2, CASK, RIMS1 and PTPRS were all co-precipitated more
380 efficiently by liprin- α 2 in HeLa-PIH1D2 cells (2.3 to 3.9 fold; Figure 7C). These data
381 demonstrate that the presence of PIH1D2, and thus of a full R2SP complex, promotes the
382 association of liprin- α 2 with several of its targets. This indicates that R2SP is involved in
383 quaternary protein folding.

384

385 **Discussion**

386 **The C-terminal domain of RPAP3 is a RUVBL1/2 binding module**

387 R2TP is a conserved HSP90 co-chaperone that is involved in the assembly of key cellular
388 complexes¹⁵. *S. cerevisiae* and human R2TP share a similar organization but striking
389 differences distinguish their RPAP3/Tah1p subunit. Human RPAP3 contains two central TPR
390 domains that bind HSP70 and HSP90, and a C-terminal domain, which is shown here to adopt
391 a novel helix-bundle fold and to bind RUVBL1/2 hexamers. In contrast, *S. cerevisiae* Tah1p is
392 six times smaller than human RPAP3 and consists of a single short TPR domain that
393 functions as an adaptor between Hsp90p and Pih1p^{17, 27}. In particular, Tah1p lacks the
394 RPAP3-Cter homology domain and consequently, the RUVBL ATPases are mainly recruited
395 by Pih1p in yeast^{28, 30}. This structural difference likely translates into different functions. In *S.*
396 *cerevisiae*, *TAH1* knock-out displays much milder phenotypes than that of *PIH1*⁴², while
397 *Drosophila* and mouse *RPAP3* are essential genes (⁴³ and unpublished observations).

398 The PIH domain of PIH1D1 recruits some client proteins via a phosphopeptide-
399 binding pocket that binds DSpDD/E motifs^{16, 17}. We show here that RPAP3-Cter binds a
400 large number of R2TP clients and is thus also involved in client recruitment. Interestingly,
401 binding of these clients is lost in RPAP3 mutants that no longer bind RUVBL1/2. RPAP3-
402 Cter could make cooperative interactions with RUVBL1/2 to bind the clients, or it may only
403 bind the ATPases, which would in turn recruit the clients. An interesting possibility would be
404 that RPAP3-Cter maintains the ATPases in a conformation suitable for client binding, in a
405 manner analogous to CDC37 for HSP90⁴⁴. In agreement with this idea, RPAP3-Cter has
406 different affinities for RUVBL mutants locked at different stages of their ATPase cycle.

407 It was recently proposed that the RUVBLs cycle between single and double ring
408 structures and that this may give them chaperone activity¹⁸. Interestingly, dimerization of the
409 hexameric rings involves their DII domains, and a recent cryo-EM structure of the *S.*

410 *cerevisiae* R2TP complex revealed that the Tah1p:Pih1p heterodimer also associates with this
411 domain. The position of Tah1p:Pih1p thus appears ideal to regulate the formation of double
412 ring structures. Given the very different interaction of human RPAP3-PIH1D1 with
413 RUVBL1/2, it will be interesting to determine whether a similar structural arrangement is
414 conserved in human R2TP.

415

416 **Human cells express a variety of complexes related to R2TP**

417 SPAG1 has an organization similar to RPAP3, with several TPR domains preceding the
418 RPAP3-Cter-like domain. Remarkably, we show here that SPAG1 binds RUVBL1/2 and
419 forms an R2TP-like complex with PIH1D2, which we termed R2SP. Our two-hybrid screen
420 shows that a short region downstream the TPR of SPAG1 is sufficient for PIH1D2 binding
421 (Table S4). Interestingly, the difference between the two isoforms of RPAP3 occurs at a
422 similar location, and this region determines binding to PIH1D1 (³⁵ and Figure 4B). This is
423 reminiscent of the binding of yeast Tah1p to Pih1p, where a short C-terminal region of yeast
424 Tah1p, located immediately downstream the TPR interacts with the CS domain of Pih1p ^{17,27}.
425 Taken together, these data suggest a model in which PIH-like and RPAP3-like proteins
426 interact via an interface composed of a CS-domain on one side and a short peptide
427 downstream the TPRs on the other. This type of interaction may also extend to DYX1C1
428 since its three isoforms, which differ in the TPR domain and the downstream flanking region,
429 interact with different PIH partners.

430 Our interaction assays indicate that cells may contain other related complexes. First,
431 an R2T complex that contains RPAP3-iso-2 and RUVBL1/2 but lacks a PIH1-like component.
432 Interestingly, this complex appears mainly nuclear and may be specialized in nuclear
433 functions. Second, an R2SD complex composed of SPAG1, DNAAF2 and RUVBL1/2. This
434 complex was not detected in our proteomic analyses and may thus form only in specific cell

435 types. Finally, DYX1C1 isoforms associate with DNAAF2 and PIH1D3 but apparently
436 without binding the RUVBLs. We also do not exclude the possibility that additional proteins
437 may be present, as the prefoldins in the case of R2TP. Overall, this study highlights the
438 variety of R2TP-like complexes.

439 With the exception of PIH1D2, all the R2TP-related proteins analyzed here have been
440 previously linked to the formation of cilia and to the assembly of axonemal dyneins^{31, 38, 45}.
441 Such a function is consistent with our and previous evolutionary analysis, which showed a
442 loss of these proteins specifically in species lacking cilia (Figure 1C and³²). However, several
443 lines of evidence suggest that they have additional functions: (i) R2SP interacts and is
444 involved in the biogenesis of proteins unrelated to cilia function; (ii) the strongest proteomic
445 partner of DNAAF2 is RTF1, which is a nuclear protein involved in transcription; (iii) a
446 CCDC103 two-hybrid screen performed with a testis library revealed only a few proteins
447 related to cilia function (see Table S4); (iv) GFP-tagged PIH1D3 and DYX1C1-iso-c are
448 predominantly nuclear, with an accumulation in uncharacterized nuclear dots. In the future, it
449 will be interesting to characterize the various functions of these R2TP-related proteins and to
450 determine the balance of direct and indirect effects in cilia formation.

451

452 **R2SP is involved in quaternary protein folding and has tissue-specific functions**

453 R2SP is enriched in testis and this could be due to two reasons: (i) it has testis-specific clients;
454 (ii) it helps ubiquitous proteins to adapt the particular environment of testis. Our data suggest
455 that both possibilities occur, since some putative clients of R2SP are enriched in testis while
456 others are ubiquitous. Interestingly, the requirements of some clients for R2SP increase at
457 32°C, the temperature of testis. This suggests that proteins selected to function at 37°C may
458 require additional help to function at 32°C.

459 In the case of liprin- α 2, we show that R2SP is required for its expression and for its
460 association with some partners. Interestingly, the R2SP subunit SPAG1 binds several liprin-
461 α 2 partners while PIH1D2 binds liprin- α 2 itself. This suggests a model in which the proteins
462 to be assembled are brought together by R2SP, thus giving them the possibility to interact
463 with each other and to access the chaperoning activity of the RUVBL1/2 ATPase (Figure 7D).
464 The independent recruitment of multiple subunits of given complexes may be a general
465 mechanism of action for this class of chaperones.

466 Liprin- α 2 is a conserved scaffolding protein that is expressed at high levels in the
467 brain and to a lesser extends in testis (Gtex Portal, ³⁷). It plays an important role in neurons,
468 where it participates to the organization of the synaptic active zone and in the coordinated
469 exocytosis of pre-synaptic vesicles ⁴⁶. Interestingly, the acrosomal reaction also requires the
470 simultaneous exocytosis of a large number of vesicles, and this process is also dependent on
471 liprins ⁴⁷. A parallel has been thus drawn between the synapse and the acrosome, leading to
472 the term "acrosomal synapse" ⁴⁸. Since PIH1D2 is also expressed in the brain, it will be
473 interesting to determine whether R2SP participates to synaptic transmission, through its action
474 on liprins.

475

476 **METHODS**

477 *Cell culture*

478 HeLa and HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
479 containing 10% fetal bovine serum (FBS), glutamin (2.9 mg/ml), and penicillin/streptomycin
480 (10 U/ml), at 37°C, 5% CO₂. For SILAC, a 3x-FLAG-GFP tag was fused at the N-terminus
481 of the indicated proteins and the fusions were stably expressed in HeLa H9 cells by Flp-In
482 recombination, using the CMV promoter to drive expression ⁴⁹. Clones were selected in
483 hygromycin (150 µg/ml), picked individually and characterized by Western blots and
484 fluorescence microscopy.

485

486 *Plasmids and cloning*

487 DNA cloning was performed using standard techniques and with the Gateway™ system
488 (Invitrogen). For pairwise two-hybrid tests, plasmids were based on pACTII and
489 pAS2ΔΔ {Hallais, 2013 #5218}. For the LUMIER assays, the baits and preys were expressed
490 in HEK293 cells from the CMV promoter for the 3xFLAG-FFL fusions, or from the mouse
491 L30 promoter for the RL fusions. The cDNAs were all of human origin except for RUVBL1
492 and RUVBL2, which were from mouse. Plasmids for in vitro expression in *Escherichia coli*
493 are described below. Detailed maps and sequences are available upon request.

494

495 *Purification of the human RUVBL1-RUVBL2*

496 Full length RUVBL1/RUVBL2 construct were purified as in ⁵⁰ without adding ADP and with
497 an extra final Superose 6 XK 16/70 (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0,
498 150 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM MgCl₂ and 0.5 mM TCEP, which resulted in a stable
499 dodecameric complex eluting as a single peak (data not shown).

500

501 ***Purification of the human RUVBL1-RUVBL2- RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ complex***

502 RUVBL1, RUVBL2 cloned in the pETDuet vector (Novagen), and RPAP3-Cter cloned in a
503 custom pET-Based vector, were co-transformed and co-expressed in *E. coli* (DE3) pRARE2,
504 during 24 h at 30 °C in EnPresso® B animal-free Media (BioSilta), by adding 100 µM of
505 IPTG, in a New Brunswick™ Innova® 44R Shaker at 225 rpm. RUVBL1 protein is the same
506 as in ⁵⁰, RUVBL2 changes to an C-terminal FLAG_FH8 Tag ⁵¹ preceded by a Human Rhino
507 3C cleavage site (HRV-3C), and RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ carries no tag.

508 The RuvBL1-RuvBL2-RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ (R1R2R3) complex was purified in a similar manner as
509 in ⁵⁰ but: in the presence of ADP, and replacing the FlagTrap by a Hydrophobic interaction
510 column (HIC), followed by the Superose 6 column. Peak fractions collected from Histrap
511 were incubated with 5 mM CaCl₂ during 1 hour and loaded onto an HiPrep™ Octyl FF 16/10
512 column (GE Healthcare) equilibrated in Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl,
513 5 % glycerol, 2 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, 0.5 mM TCEP, 300 µM ADP). Bound proteins were
514 eluted using Buffer D (Buffer C without CaCl₂, supplemented with 5 mM EDTA). To remove
515 FLAG_FH8 tag the collected samples were incubated 18 h at 4° C with 1% (w/w) HRV-3C
516 protease (Thermo Fisher Scientific).

517 To separate oligomeric species, FLAG_FH8 and protease, we used the Superose 6
518 equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM
519 TCEP and 400 µM ADP, which resulted in a stable R1/R2 hexameric complex bound to
520 RPAP3-Cter eluting as a single peak (Figure 2F). The peak fractions were pooled and
521 concentrated to final 12.5 mg/ml using a 10 kDa Cut-off Amicon Ultra centrifugal filter
522 (Millipore). All purification steps were carried out at room temperature and were monitored
523 by NuPage Bis-Tris gels (Invitrogen NP0302).

524

525 ***Purification of RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ and NMR sample preparation***

526 Overexpression, purification and sample conditions of soluble $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled RPAP3₅₃₅₋₆₆₅
527 domain were done with previously described methods ⁵². Briefly, recombinant protein
528 domains were overexpressed in a minimal M9 medium complemented with ^{15}N -NH₄Cl and
529 ^{13}C -d6-Glucose and purified on TALON beads with a cleavable 6xHis-tag in 25 mM HEPES,
530 pH 7.5, 300 mM NaCl. A final size exclusion chromatography performed in 10 mM NaPi, pH
531 6.4, 150 mM NaCl and 0.5 mM TCEP provided $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled samples at a concentration of
532 1 mM.

533

534 *NMR structure calculation*

535 Classical 3D NMR spectra were recorded at 298K on a 600 MHz AVANCE III spectrometer
536 equipped with a cryoprobe. This permitted to obtain almost complete ^1H , ^{13}C and ^{15}N
537 resonance assignments of RPAP3₅₃₅₋₆₆₅. Chemical shifts were referenced to DSS and derived
538 into dihedral angle restraints with TALOS-N ⁵³. Automated procedure of CYANA 3.97 ⁵⁴ was
539 then used to derive distance restraints from 2D ^1H - ^1H NOESY and 3D ^{15}N - and ^{13}C -
540 NOESYHSQC spectra, all recorded with a mixing time of 120 ms. The final sets of dihedral
541 angle and inter-proton restraints were carefully checked and used to generate 100 CYANA
542 structures, which were refined in explicit water using the AMBER-based Portal Server for
543 NMR structures (AMPS-NMR; ^{55, 56}. The 20 structures with the lowest constraint energies
544 were selected as the most representative. In the final set of structures, 94.3% and 5.7% of the
545 residues lie respectively in the most favored and allowed regions of the Ramachandran plot.
546 All 3D structures were drawn with Pymol ⁵⁷. 3D coordinates and NMR chemical shifts of
547 RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ were deposited in the Protein Data Bank and in the Biological Magnetic
548 Resonance Data Bank under respective entry codes 6EZ4 and 34200.

549

550 *NMR interaction experiments*

551 1D METHYL-SOFAST-HMQC spectra were recorded to monitor the binding of unlabeled
552 RUVBL proteins to ¹³C-labeled RPAP3₅₃₅₋₆₆₅. The ¹H dimension was edited, which permitted
553 to only detect ¹H nuclei attached to ¹³C nuclei. Interaction experiments were performed at
554 298K and at 600 MHz in the RUVBL1/2 buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 5%
555 glycerol, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM TCEP). RUVBL1 was N-terminally tagged with a
556 6xHistidine and RUVBL2 with a 3xFLAG. Concentration of ¹³C-labeled proteins was around
557 10 μM. Protons attached to ¹³C nuclei lying between 5 and 35 ppm were selectively excited
558 on a band width of 3 ppm and centered at 0 ppm. The relaxation delay was set to 150 ms and
559 the number of scans to 2048. The final concentration ratio between unlabeled and labeled
560 proteins was 1:1 (one monomer of RPAP3-Cter and one heterodimer of RUVBL1/2).

561

562 *Non-denaturing mass spectrometry analysis*

563 For non-denaturing mass spectrometry analysis, samples were buffer exchanged against
564 ammonium acetate (150 mM, pH 8.0) buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), using Zeba Spin
565 desalting columns (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Sample concentrations
566 were determined by UV absorbance using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo
567 Fisher Scientific, France). Mass spectrometry analyses were carried out on a hybrid
568 electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters,
569 Manchester, UK) coupled to an automated chip-based nanoelectrospray source (Triversa
570 Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, U.S.A.) operating in the positive ion mode. Mass
571 spectrometer calibration was performed using singly charged ions produced by a 2 mg/mL
572 solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1v/1v) over the m/z range 1,000-20,000.
573 Instrumental parameters have been optimized to get optimal high m/z ion transmission
574 without dissociation of weak non-covalent interactions by raising the backing pressure to 6
575 mbar and the cone voltage to 100 V. Data interpretation was performed using MassLynx 4.1
576 (Waters, Manchester, UK).

577

578 ***SPR interaction experiments***

579 RPAP3-Cter protein was immobilized onto CM5 (Series S) sensor chips using standard amine
580 coupling. HBS-N, which consisted of 10 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M NaCl, was used as the
581 background buffer. The carboxymethyl surface of the chip was activated with 20 mM EDC
582 and 5 mM NHS for 1.5 min. RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ was diluted in 10 mM Sodium Acetate, pH 5.5, to a
583 concentration of 1 µg/ml. The protein was coupled to the surface with a 1 to 2 min injection
584 time at a flow rate of 10 µl.min⁻¹. The remaining activated groups were blocked with a 5
585 minute injection of 1.0 M ethanolamine, pH 8.5. Typically, 100 ± 10 response units (RU)
586 were obtained for the immobilization of RPAP3-Cter protein. Negative controls were
587 performed by immobilizing either Bovine Serum Albumin (BSA, Thermo Fisher Scientific)
588 or human Cyclophilin D₄₃₋₂₀₇ (CypD) with the same RU levels as RPAP3-Cter. CypD₄₃₋₂₀₇ is a
589 22 kDa in-house purified protein with similar size to RPAP3-Cter and confirmed to be active
590 through binding to Cyclosporin A. The RUVBL1-RUVBL2 complex was directly dissolved
591 in running buffer (20 mM NaKPi pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05%
592 P20). The RUVBL1-RUVBL2 complex was tested at 10 different concentrations using a 2-
593 fold dilution series, with the highest concentration tested being 75.2 nM. Interaction analysis
594 cycles consisted of a 300 second sample injection (30 µl.min⁻¹; association phase) followed
595 by 600 second of buffer flow (dissociation phase). All sensorgrams were processed by first
596 subtracting the binding response recorded from the control surface (reference spot), followed
597 by subtracting of the buffer blank injection from the reaction spot. All datasets were fit to a
598 simple 1:1 Langmuir interaction model (one molecule of RPAP3 binding one hexamer of
599 RUVBL1/2), to determine the kinetic rate constants. Experiments were performed on a
600 Biacore 4000 (Biacore AB, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) at 25 °C and the
601 interactions were evaluated using the provided Biacore 4000 evaluation software.

602

603 ***SILAC proteomics***

604 SILAC experiments were performed as previously described ⁷. HeLa cells were grown for 15
605 days in each isotopically labeled media (CIL/Eurisotop), to ensure complete incorporation of
606 isotopically labeled arginine and lysine (light label (K0R0, L) or semi-heavy label L-Lysine-
607 ²HCl (²H4, 96–98%)/L-Arginine-HCl (¹³C6, 99%) (K4R6, M) or L-Lysine-2HCl (¹³C6, 99%;
608 ¹⁵N2, 99%)/L-Arginine-HCl (¹³C6, 99%; ¹⁵N4, 99%) heavy label (K8R10, H) (percentages
609 represent the isotopic purity of the labeled amino acids). Three 15-cm diameter plates were
610 used per SILAC condition. Cells were rinsed with PBS, trypsinized and cryogrounded in lysis
611 buffer (0.5% triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, protease inhibitor
612 cocktail). Extracts were incubated 20 min at 4°C and clarified by centrifugation for 10 min at
613 20,000 g. For all IP experiments, extracts were pre-cleared by incubation with Protein G
614 Sepharose beads (GE healthcare) for 1 h at 4°C. The control was extracted from the SILAC
615 light condition prepared from H9 HeLa cells that did not express the GFP fusion. Each extract
616 was then incubated with 50 µl of GFP-Trap beads (ChromoTek) for 75 min at 4°C, washed
617 five times with lysis buffer, and beads from the different isotopic conditions were finally
618 pooled. Bound proteins were eluted by adding 1% SDS to the beads and boiling for 10 min.

619 The eluate was then reduced with DTT (BDH 443553B, 10 mM) at 95°C for 2 min
620 and alkylated using iodoacetamide (Sigma I1149, 50 mM) for 30 min in the dark. Proteins
621 were separated on SDS/PAGE, the lanes of interest were cut in 10 slices, and proteins were in
622 gel-digested with trypsin in 20 mM NH₄HCO₃ (Trypsin Gold, Promega V5280). Peptides
623 were extracted from gel pieces and resuspended in 0.1% formic acid/2% acetonitrile solution
624 before being analyzed by mass spectrometry. Peptides were analyzed by nano-flow liquid
625 chromatography coupled to Fourier transform tandem mass spectrometry (nanoLC-FT-
626 MS/MS) using a LTQ Velos Pro Orbitrap Elite mass spectrometer coupled to an Ultimate
627 3000 (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were performed

628 on-line on a Pepmap precolumn (0.3 mm 10 mm, Thermo Fisher Scientific) in buffer A (2%
629 acetonitrile, 0.1% formic acid). A gradient consisting of 2–40% buffer B (B = 99.9%
630 acetonitrile with 0.1% formic acid; 3–33 min), 40–80% B (33–34 min), 80–0% B (49–50
631 min), and equilibrated for 20 min in 0% B (50–70 min) was used to elute peptides at 300
632 nL/min from a Pepmap capillary reversed-phase column (0.075 mm x 150 mm, Thermo
633 Fisher Scientific). Mass spectra were acquired using a top-20 collision-induced dissociation
634 (CID) data-dependent acquisition (DDA) method. The LTQ-Orbitrap was programmed to
635 perform a FT full scan (60,000 resolution) on 400–1,400 Th mass range with the top twenty
636 ions from each scan selected for LTQ-MS/MS. FT spectra were internally calibrated using a
637 single lock mass (445.1200 Th). Target ion numbers were 500,000 for FT full scan on the
638 Orbitrap and 10,000 MSn on the LTQ. Data were acquired using the Xcalibur software v2.2.
639 Protein identification and quantitation were performed using the program MaxQuant (version
640 1.5.2.8; <http://www.maxquant.org/>). Few parameters were not default: database: human
641 reference proteome set (canonical isoforms downloaded from ExPASy on May 29th 2017);
642 enzyme specificity trypsin/P; variable modifications: methionine oxidation and protein N-
643 Acetylation; Fixed modifications: Cysteine carbamidomethylation; MS/MS tolerance: 0.5 Da;
644 False Discovery Rate (FDR): 1%. In addition to the FDR, proteins were considered to be
645 identified if they had at least two peptides including one unique/Razor peptide and they were
646 considered quantified if they had at least one quantified SILAC pairs. Proteins labeled as
647 REV (non-real proteins from the reverse database) and CONT (contaminants) were
648 automatically discarded, as well as proteins that did not show any SILAC M/L, H/L and H/M
649 ratio. B Significance calculation were done with the software Perseus v1.4.2 as previously
650 described⁵⁸ to highlight statistically significant protein ratios (pvalue<0.05).

651

652 ***LUMIER assays***

653 HEK293 cells were seeded in 24-well plates and transfected with 450 ng of the RL fusion and
654 50 ng of the 3xFLAG-FFL fusion, with 1 μ l of JetPrime (PolyPlus), as recommended by the
655 manufacturer. 48 hours later, cells were extracted for 15 minutes at 4°C in 450 μ l of HNTG
656 containing protease inhibitor cocktail (Roche), and spun down at 4°C and at 20,000g for 15
657 minutes. The IP was performed in duplicated, by putting 100 μ l of the extract in each of four
658 wells in a 96-well plate, with two wells being coated with anti-FLAG antibody (see below),
659 and two control wells without antibodies. Plates were incubated for 3h at 4°C, and then
660 washed 5 times with 300 μ l of ice-cold HNTG, for 10 minutes at 4°C for each wash. After the
661 last wash, 10 μ l of PBL buffer (Promega) was added in each well. To measure the input, 2 μ l
662 of extract and 8 μ l of 1xPBL buffer was put in empty remaining wells. Plates were then
663 incubated 5 minutes at room temperature, and FFL and RL luciferase activities were
664 measured in IP and input wells, using the dual luciferase kit (Promega). Every transfection
665 was performed at least twice as independent replicates. Co-IP efficiency was defined as the
666 RL/FFL ratio in the pellet, divided by the RL/FFL ratio in the input. Unless otherwise stated,
667 statistical significance was evaluated using Z-test assaying whether the co-IP efficiency in the
668 anti-FLAG IP was more than 6 times higher than the mean values obtained in the control IP,
669 done without antibodies. This threshold of 6 corresponds to the mean plus two standard
670 deviations of the FLAG/control fold difference obtained with a set of 36 assays done with
671 non-interacting proteins (see Figure S4A). It ensures that only specific interactions are
672 identified.

673 To coat the wells of the 96-well plates with M2 anti-FLAG antibodies, High-binding
674 plates were used (Lumitrac, Greiner), and 70 μ l of M2 antibody (10 μ g/ml in 1x PBS; F1804
675 Sigma-Aldrich) was put in each well and incubated overnight at room temperature in the dark.
676 The next day, wells were blocked with 300 μ l of blocking buffer, for 1 hour at room
677 temperature. IP control wells were treated the same way except that no antibody was put in

678 the well. Blocking buffer was 3% BSA, 5% sucrose, 0.5% Tween 20, 1x PBS). HNTG buffer
679 was 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM
680 MgCl₂, 1 mM EGTA.

681

682 ***Luciferase assays***

683 H9 HeLa cells were grown on 24-well plates and co-transfected with plasmids expressing a
684 Flag-tagged Firefly luciferase (FFL) in fusion with the protein of interest, and with a plasmid
685 coding Renilla luciferase as control (RL). After 48 h, cells were extracted in 100 µl of 1x PLB
686 buffer (Promega) and incubated at 4°C for 15 minutes. RL and FFL activities were measured
687 on 96-well plates using 10 µl of cell extract and the dual-luciferase assay kit (Promega).
688 Values obtained for FFL were normalized to RL values. Experiments were done at least in
689 triplicate.

690

691 ***Microscopy***

692 HeLa cells expressing the GFP-fusion of interest were plated on glass coverslips, fixed one
693 day later, and mounted in Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories). Cells were
694 imaged using an upright epifluorescence microscope (Zeiss AxioImager Z1,) with a x63 oil
695 objective (NA 1.4). Images were captured with a sCMOS camera (Hamamatsu) and mounted
696 in Photoshop.

697

698 ***Genomes and Sequence analyses***

699 Sequences were retrieved from the NCBI annotated databases (nr and EST,
700 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using NCBI PHI-BLAST as well as BLAST and Annotation
701 search tools available in the Geneious 9.1.8 software package (Biomatters,
702 <http://www.geneious.com/>). Amino acid sequences were aligned using MAFFT v7.017⁵⁹.

703 Orthology was determined by reciprocal BLAST analysis and domain architecture. The 288
704 accession numbers used for the Figure are listed in Table S5.

705

706 ***Pairwise yeast two-hybrid assays***

707 Plasmids pACT2 and pAS2ΔΔ were introduced into haploid *Saccharomyces cerevisiae* strains
708 (Y187 and CG1945, respectively). Strains were crossed and diploids were selected on –Leu
709 –Trp selective media and then plated on triple selective media (–Leu –Trp –His). Growth was
710 assessed visually after 3 days at 30°C. The strength of interactions was evaluated by
711 comparing the number of clones growing on –Leu –Trp (selection of diploids) and –Leu –Trp
712 –His plates (selection for interaction).

713

714 ***Yeast two-hybrid screens***

715 Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics Services, S.A.S., Paris, France
716 (<http://www.hybrigenics-services.com>). The coding sequence for full-length (1-315) PIH1D2
717 (NCBI reference NM_138789) was PCR-amplified and cloned into pB27 plasmid as a C-
718 terminal fusion to LexA (LexA-PIH1D2). The construct was checked by sequencing the
719 entire insert and used as a bait to screen two random-primed cDNA library constructed into
720 pP6 plasmid. The first one was a made from human testis cDNAs, and the second one from
721 cDNAs made from three human lung cancer cell lines: A549, H1703 and H460. pB27 and
722 pP6 derive from pBTM116⁶⁰ and pGADGH⁶¹ plasmids, respectively.

723 As many as 31 and 51 million clones were screened for the human testis and the
724 human lung cancer library, respectively. This represents 3-fold and 5-fold the complexity of
725 the respective libraries. Screening was done using a mating approach with YHGX13 (Y187
726 *ade2-101::loxP-kanMX-loxP*, *Mato*) and L40ΔGal4 (*Mata*) yeast strains, as previously
727 described⁶². For the testis, screen, 182 His⁺ colonies were selected on a medium lacking

728 tryptophan, leucine and histidine, while for the lung cancer library, 345 His⁺ colonies were
729 selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine and supplemented with 50
730 mM 3-aminotriazole to maintain a strong selectivity. The prey fragments of the positive
731 clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting
732 sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank
733 database (NCBI) using a fully automated procedure.

734 A confidence score (PBS, for Predicted Biological Score) was attributed to each
735 interaction as previously described ⁶³. This score relies on two different levels of analysis.
736 Firstly, a local score takes into account the redundancy and independency of prey fragments,
737 as well as the distribution of reading frames and stop codons in overlapping fragments.
738 Secondly, a global score takes into account the interactions found in all the screens performed
739 at Hybrigenics using the same library. This global score represents the probability of an
740 interaction being nonspecific. For practical use, the scores were divided into four categories,
741 from A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) specifically flags
742 interactions involving highly connected prey domains previously found several times in
743 screens performed on libraries derived from the same organism. Several of these highly
744 connected domains have been confirmed as false-positives of the technique and are tagged as
745 F. The PBS scores have been shown to positively correlate with the biological significance of
746 interactions ^{64, 65}.

747

748 **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

749 Statistical tests were done with excel.

750

751 **References**

- 752 1. Zhao R, *et al.* Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and
753 genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**, 715-727 (2005).
- 754 2. Houry WA, Bertrand E, Coulombe B. The PAQosome, an R2TP-Based Chaperone for
755 Quaternary Structure Formation. *Trends Biochem Sci* **43**, 4-9 (2018).
- 756 3. Boulon S, *et al.* The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through
757 conserved machinery. *J Cell Biol* **180**, 579-595 (2008).
- 758 4. Bizarro J, *et al.* NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and
759 facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res* **43**, 8973-8989 (2015).
- 760 5. Cloutier P, *et al.* High-resolution mapping of the protein interaction network for the
761 human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-
762 associated complexes. *Methods* **48**, 381-386 (2009).
- 763 6. Malinova A, *et al.* Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the
764 HSP90/R2TP chaperones. *J Cell Biol* **216**, 1579-1596 (2017).
- 765 7. Boulon S, *et al.* HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the
766 cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* **39**, 912-924 (2010).
- 767 8. Cloutier P, Coulombe B. New insights into the biogenesis of nuclear RNA
768 polymerases? *Biochem Cell Biol* **88**, 211-221 (2010).
- 769 9. Jeronimo C, *et al.* Systematic analysis of the protein interaction network for the
770 human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol*
771 *Cell* **27**, 262-274 (2007).
- 772 10. Horejsi Z, *et al.* CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is
773 essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol Cell* **39**, 839-850 (2010).
- 774 11. Kaizuka T, *et al.* Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin
775 complex assembly. *J Biol Chem* **285**, 20109-20116 (2010).
- 776 12. Takai H, Xie Y, de Lange T, Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-
777 dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev* **24**, 2019-2030
778 (2010).
- 779 13. Boulon S, Bertrand E, Pradet-Balade B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex:
780 building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA*
781 *Biol* **9**, 148-154 (2012).
- 782 14. von Morgen P, *et al.* MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with
783 R2TP complex. *Oncogene* **36**, 4943-4950 (2017).
- 784 15. Coulombe B, Bertrand E, Houry WA. PAQosome: an R2TP-based chaperone for
785 quaternary structure formation. *Trends Biochem Sci* **in press**, (2017).
- 786 16. Horejsi Z, *et al.* Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate
787 specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell reports* **7**, 19-26 (2014).

- 788 17. Pal M, *et al.* Structural Basis for Phosphorylation-Dependent Recruitment of Tel2 to
789 Hsp90 by Pih1. *Structure*, (2014).
- 790 18. Zhou CY, *et al.* Regulation of Rvb1/Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin
791 Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones.
792 *Cell reports* **19**, 2033-2044 (2017).
- 793 19. Bizarro J, *et al.* Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP
794 assembly mechanism and its control. *J Cell Biol* **207**, 463-480 (2014).
- 795 20. Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. Crystal structure of the human
796 AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem* **281**, 38918-38929 (2006).
- 797 21. Ewens CA, Su M, Zhao L, Nano N, Houry WA, Southworth DR. Architecture and
798 Nucleotide-Dependent Conformational Changes of the Rvb1-Rvb2 AAA+ Complex
799 Revealed by Cryoelectron Microscopy. *Structure* **24**, 657-666 (2016).
- 800 22. Lakomek K, Stoehr G, Tosi A, Schmailzl M, Hopfner KP. Structural basis for
801 dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+
802 ATPases Rvb1 . Rvb2. *Structure* **23**, 483-495 (2015).
- 803 23. Cloutier P, *et al.* R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly
804 interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein.
805 *Nature communications* **8**, 15615 (2017).
- 806 24. McKeegan KS, Debieux CM, Watkins NJ. Evidence that the AAA+ proteins TIP48
807 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58
808 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol Cell Biol* **29**, 4971-4981 (2009).
- 809 25. Machado-Pinilla R, Liger D, Leulliot N, Meier UT. Mechanism of the AAA+
810 ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA* **18**, 1833-1845
811 (2012).
- 812 26. Quinternet M, *et al.* Structure/Function Analysis of Protein-Protein Interactions
813 Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP
814 Assembly. *J Mol Biol* **427**, 2816-2839 (2015).
- 815 27. Back R, *et al.* High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to
816 the R2TP complex. *Structure* **21**, 1834-1847 (2013).
- 817 28. Rivera-Calzada A, *et al.* The Structure of the R2TP Complex Defines a Platform for
818 Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular Chaperone System.
819 *Structure*, (2017).
- 820 29. Tian S, *et al.* Pih1p-Tah1p Puts a Lid on Hexameric AAA+ ATPases Rvb1/2p.
821 *Structure* **25**, 1519-1529 e1514 (2017).
- 822 30. Paci A, Liu XH, Huang H, Lim A, Houry WA, Zhao R. The stability of the small
823 nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces*
824 *cerevisiae* is modulated by its C terminus. *J Biol Chem* **287**, 43205-43214 (2012).
- 825 31. Tarkar A, *et al.* DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary
826 motility. *Nat Genet* **45**, 995-1003 (2013).

- 827 32. Yamamoto R, Hirono M, Kamiya R. Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic
828 preassembly of different subsets of axonemal dyneins. *J Cell Biol* **190**, 65-71 (2010).
- 829 33. Quinternet M, Starck JP, Delsuc MA, Kieffer B. Unraveling complex small-molecule
830 binding mechanisms by using simple NMR spectroscopy. *Chemistry* **18**, 3969-3974
831 (2012).
- 832 34. Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, Kube S. Structure and function of the AAA+
833 nucleotide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 2-14 (2012).
- 834 35. Yoshida M, *et al.* RPAP3 splicing variant isoform 1 interacts with PIH1D1 to
835 compose R2TP complex for cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 320-
836 324 (2013).
- 837 36. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol*
838 *Cell Biol* **18**, 345-360 (2017).
- 839 37. Thul PJ, *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, (2017).
- 840 38. Olcese C, *et al.* X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the
841 cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nature communications* **8**,
842 14279 (2017).
- 843 39. Stryker E, Johnson KG. LAR, liprin alpha and the regulation of active zone
844 morphogenesis. *J Cell Sci* **120**, 3723-3728 (2007).
- 845 40. Chia PH, Patel MR, Wagner OI, Klopfenstein DR, Shen K. Intramolecular regulation
846 of presynaptic scaffold protein SYD-2/liprin-alpha. *Mol Cell Neurosci* **56**, 76-84
847 (2013).
- 848 41. Wei Z, Zheng S, Spangler SA, Yu C, Hoogenraad CC, Zhang M. Liprin-mediated
849 large signaling complex organization revealed by the liprin-alpha/CASK and liprin-
850 alpha/liprin-beta complex structures. *Mol Cell* **43**, 586-598 (2011).
- 851 42. Zhao R, Houry WA. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation.
852 *Biochem Cell Biol* **83**, 703-710 (2005).
- 853 43. Benbahouche Nel H, *et al.* Drosophila Spag is the homolog of RNA polymerase II-
854 associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70
855 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *J Biol Chem* **289**, 6236-6247
856 (2014).
- 857 44. Roe SM, *et al.* The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific
858 cochaperone p50(cdc37). *Cell* **116**, 87-98 (2004).
- 859 45. Omran H, *et al.* Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal
860 dyneins. *Nature* **456**, 611-616 (2008).
- 861 46. Torres VI, Inestrosa NC. Vertebrate Presynaptic Active Zone Assembly: a Role
862 Accomplished by Diverse Molecular and Cellular Mechanisms. *Molecular*
863 *neurobiology*, (2017).
- 864 47. Joshi CS, Khan SA, Khole VV. Regulation of acrosome reaction by Liprin alpha3,
865 LAR and its ligands in mouse spermatozoa. *Andrology* **2**, 165-174 (2014).

- 866 48. Joshi CS, Suryawanshi AR, Khan SA, Balasinor NH, Khole VV. Liprin alpha3: a
867 putative estrogen regulated acrosomal protein. *Histochemistry and cell biology* **139**,
868 535-548 (2013).
- 869 49. Hallais M, *et al.* CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families
870 and favors cap-proximal processing. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1358-1366 (2013).
- 871 50. Gorynia S, Matias PM, Bandejas TM, Donner P, Carrondo MA. Cloning, expression,
872 purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvBL1-
873 RuvBL2 complex. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and*
874 *crystallization communications* **64**, 840-846 (2008).
- 875 51. Costa SJ, Coelho E, Franco L, Almeida A, Castro A, Domingues L. The Fh8 tag: a
876 fusion partner for simple and cost-effective protein purification in *Escherichia coli*.
877 *Protein Expr Purif* **92**, 163-170 (2013).
- 878 52. Rothe B, *et al.* Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls
879 cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic*
880 *Acids Res* **42**, 10731-10747 (2014).
- 881 53. Shen Y, Bax A. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR
882 chemical shifts using artificial neural networks. *J Biomol NMR* **56**, 227-241 (2013).
- 883 54. Lopez-Mendez B, Guntert P. Automated protein structure determination from NMR
884 spectra. *J Am Chem Soc* **128**, 13112-13122 (2006).
- 885 55. Bertini I, Case DA, Ferella L, Giachetti A, Rosato A. A Grid-enabled web portal for
886 NMR structure refinement with AMBER. *Bioinformatics* **27**, 2384-2390 (2011).
- 887 56. Casey JP, *et al.* A case report of primary ciliary dyskinesia, laterality defects and
888 developmental delay caused by the co-existence of a single gene and chromosome
889 disorder. *BMC medical genetics* **16**, 45 (2015).
- 890 57. Schrodinger L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (ed[^](eds)
891 (2015).
- 892 58. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide
893 label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio
894 extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513-2526 (2014).
- 895 59. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple
896 sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059-3066
897 (2002).
- 898 60. Vojtek AB, Hollenberg SM. Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods*
899 *Enzymol* **255**, 331-342 (1995).
- 900 61. Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. Elimination of false positives that arise in
901 using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924 (1993).
- 902 62. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast
903 genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* **16**, 277-282 (1997).

- 904 63. Formstecher E, *et al.* Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome*
905 *Res* **15**, 376-384 (2005).
- 906 64. Rain JC, *et al.* The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori. *Nature* **409**,
907 211-215 (2001).
- 908 65. Wojcik J, Boneca IG, Legrain P. Prediction, assessment and validation of protein
909 interaction maps in bacteria. *J Mol Biol* **323**, 763-770 (2002).
- 910

911 **Acknowledgments**

912 This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer, INCa PLBio
913 2016-161 and ANR-16-CE11-0032-04 to EB, and from the French Proteomic Infrastructure
914 (ProFI; ANR-10-INBS-08-03) to SC. The work was also supported by GIS IBiSA and Région
915 Alsace, by FCT–Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (project PTDC/BBB-
916 BEP/1463/2014), iNOVA4Health Research Unit (LISBOA-01-0145-FEDER-007344;
917 cofunded by Fundação para a Ciência e Tecnologia/Ministério da Ciência e do Ensino
918 Superior), and by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement. PES was supported by
919 fellowship SFRH/BD/111603/2015, CM and CA were supported by fellowships from the
920 Ligue Nationale Contre le Cancer; MB was supported by a fellowship from the Région
921 Alsace; Daniel Schwarz is acknowledged for his input on the SPR experiments, and P. Barbry
922 for helpful discussions.

923

924 **Author contribution**

925 CM, MQ, BB, MEC, ACFP, PFa, XM, PES, PMFS, EB, CA, YA, MB and CV performed the
926 experiments. FV performed mass spectrometry and statistical. JCR performed yeast two-
927 hybrid screens. MQ, XM, BC, TB, CV, SC, BPB, EB supervised the work; MQ, Pfo, MB,
928 PS and EB prepared the Figures. MQ, XM, BC, CV, BPB and EB conceived the study; MQ,
929 XM, CV, BPB and EB wrote the manuscript.

930

931 **Figure Legends**

932 **Figure 1. Solution structure of the C-terminal domain of human RPAP3**

933 A-Schematic representation of the human R2TP complex.

934 B-Domain architecture of RPAP3 (numbering corresponds to amino-acids of isoform 1).

935 C-Conservation of RPAP3 and PIH repertoires across Eukaryotes. Members in which TPR

936 (pfam 13414) or Dynein attachment (pfam 15867) domains are associated to the canonical

937 RPAP3_C are colored as indicated at the left. Clades or species that have lost flagella or in

938 which cilia are not motile are in grey background. Members that were not found are indicated

939 by "x".

940 D-Backbone view of the superposition of the best 20 NMR structures of human RPAP3-Cter,

941 with α -helices indicated in violet.

942 E-Sequence of RPAP3-Cter, with corresponding α -helices.

943 F-Backbone orthogonal views (180°C) of RPAP3-Cter structure in ribbon representation with

944 corresponding α -helices.

945

946 **Figure 2. RPAP3-Cter interacts with RUVBL1/2 hexamers.**

947 A-SILAC proteomic analysis of RPAP3-Cter. The graph depicts the proteins identified in

948 anti-GFP immuno-precipitates of HeLa cells expressing GFP-RPAP3-Cter. Each dot is a

949 protein and the color code is indicated below the graph. x-axis: protein abundance (Log10 of

950 signal intensity); y-axis: enrichment over a control IP (Log2 of SILAC ratio).

951 B-NMR interaction analysis of RPAP3-Cter with recombinant RUVBL1/2 complex. The

952 graph depicts 1D NMR METHYL-SOFAST-HMQC spectra in the methyl region of ^{13}C -

953 labeled RPAP3-Cter alone (top lane) or mixed with recombinant RUVBL1/2 complex

954 (bottom lane). Intensity of the NMR signal (arbitrary units, y-axis) is plotted against the ^1H

955 chemical shift (in ppm, x-axis).

956 C-SPR binding assays of RPAP3-Cter with RUVBL1/2. The graph depicts the response upon
957 injecting the RUVBL1/2 complex (t=0s), or upon washing (t=300s), on immobilized RPAP3-
958 Cter. x-axis: time (s); y-axis: response (arbitrary units). These data have been obtained with
959 the same batch of RUVBL1/2 complex as in the control experiment (Figure S2C).

960 D-Native mass spectrometry analysis of recombinant RUVBL complexes. The upper mass
961 spectrum presents the purified RUVBL1/2 complex. The bottom mass spectrum presents the
962 same complex after addition of RPAP3-Cter. y-axis: signal intensity; x-axis: m/z. Insets:
963 zoom over the 8000-9000 m/z region. Schematics depict the complex observed. Blue:
964 RUVBL proteins; red: RPAP3-Cter.

965 E-Chromatographic analysis of the RUVBL complexes. The graph depicts the chromatograms
966 of purified RUVBL1-RUVBL2 (dashed grey, left y axis) or RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter
967 (black line, right y axis), on a Superose 6 16/70 XK. x-axis: elution volume; y-axis:
968 absorbance.

969 F-Electrophoresis of the purified RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter complex. The gel shows
970 the peak fraction of the complex eluted from the column (black line in E), with a purity
971 estimated to ~95 %. Lane 1: Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad); Lane 2:
972 denatured RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter complex. Black arrow: RUVBL1 and RUVBL2
973 (52 and 53 kDa, respectively); grey arrow: RPAP3-Cter (15 kDa).

974
975 **Figure 3. The RPAP3 C-terminal domain interacts with R2TP clients via RUVBL1/2**
976 **multimers.**

977 A-Yeast two-hybrid analysis of interactions between RUVBL2 and RPAP3-Cter mutants.
978 Alix is a negative control. ***: strong interaction; **: medium; *: weak; -: no interaction.

979 B-Molecular surface representation of RPAP3-Cter structure, with the location of the mutants
980 loosing interaction with RUVBL1/2 indicated in red. Blue: mutated residues not involved in
981 RUVBL1/2 binding.

982 C-LUMIER assay showing the *in vivo* interaction between RPAP3-Cter and RUVBL1/2
983 mutant proteins. Top panel: schematic representation of the assay. Bottom panel: graph
984 plotting the IP efficiency of the indicated proteins. The values are the IP efficiencies of the
985 co-precipitation of the RL fusion proteins (IP/Input), normalized by the IP/Input values
986 obtained with the anti-FLAG IP of the 3xFLAG-FFL fusion protein. Error bars: standard
987 deviation. Stars: values significantly greater than six-times the mean value obtained in the
988 control IPs without anti-FLAG antibody (Ct). **: p-value<0.001 (Z-test).

989 D, E-SILAC proteomic analysis of the partners of RPAP3-Cter-Mut1 and RPAP3-Cter-Mut2,
990 repectively. Legend as in Figure 2A.

991

992 **Figure 4. RPAP3-like and PIH1-like proteins interact with each other.**

993 A-Architecture of the human proteins containing a RPAP3-Cterminal domain (RPAP3-C), or
994 a PIH domain (PIH). Coiled-coil (CC), CHORD-containing proteins and SGT1 domain (CS)
995 and TPR domains (TPR) are also indicated. Different splicing isoforms of RPAP3 and
996 DYX1C1 are shown, with their variable domains in hatched violet (RPAP3), or yellow
997 (DYX1C1).

998 B-Summary of pairwise LUMIER interaction assays between the indicated proteins. The
999 values are the efficiencies of the co-precipitation of the RL fusion proteins (IP/Input),
1000 expressed in percent of the efficiencies obtained with the 3xFLAG-FFL fusions. p-values are
1001 shown in Figure S4C.

1002 C-LUMIER interaction assays between RL-RUVBL1/2 and RPAP3-like proteins tagged with
1003 3xFLAG-FL. Legend as in Figure 3C. Stars: values significantly greater than six-times the
1004 mean value obtained in the control IP (Ct). **: p-value<0.001 (Z-test).

1005

1006 **Figure 5. Identification of R2TP-like complexes.**

1007 A-LUMIER interaction assays between SPAG1 and RUVBL1/2. Legend as in Figure 3C
1008 excepted that an untagged PIH1D2 was co-expressed (lanes '+'), or SMD1 as control (lanes '-').
1009 B-SILAC proteomic analysis of the partners of GFP-PIH1D2, GFP-DNAAF2, GFP-
1010 CCDC103, and GFP-PIH1D3, performed in HeLa cells. Legend as in Figure 2A. The color
1011 code is indicated between the graphs.
1012 C-Models of possible R2TP-related complexes.

1013

1014 **Figure 6. Identification of PIH1D2 partners.**

1015 A-Results of yeast two-hybrid screens using human PIH1D2 as bait and performed with
1016 human libraries from lung carcinoma cell lines and testis. The color of the lines indicate the
1017 strength of the Y2H interaction (PBS score). A: red; B: dark blue; C: green; D: light blue.
1018 Lines with two dots indicate that the prey was found in the two libraries.
1019 B-Validation of the hits found in the yeast two-hybrid screens by LUMIER co-IP assays. The
1020 graph depicts the results of LUMIER co-IP assays performed with the indicated proteins.
1021 Legend as in Figure 3C, with '*' indicating a p-value <0.05, and '**' a p-value<0.001.

1022

1023 **Figure 7. The R2SP complex promotes the stabilization of its clients and the assembly of**
1024 **liprin- α 2 complexes.**

1025 A-R2SP enhances expression of some of its clients. The graph depicts the relative expression
1026 levels of the indicated FFL-fusion proteins in HeLa cells expressing PIH1D2, versus parental
1027 HeLa cells not expressing it. Dark blue: experiment performed at 37°C; light blue: experiment
1028 performed at 32°C. Values are normalized by the mean of controls (left); **: p-value <0.02
1029 with a t-test involving all the control samples (n \geq 3).
1030 B-Binding of PPFA2-related proteins to SPAG1 and PIH1D2. The graph depicts LUMIER
1031 interaction assays between the indicated proteins. Legend as in Figure 3C, with '*' indicating a
1032 p-value <0.05, and '**' a p-value<0.001.

1033 C-R2SP promotes association of liprin- α 2 (PPFIA2) with its partners. The graph depicts
1034 LUMIER interaction assays between PPFIA2 and its partners, in HeLa cells expressing or not
1035 PIH1D2. Legend as in Figure 3C, with single black stars indicating a p-value <0.05, and
1036 double black stars a p-value<0.001 (Z-test comparing values of the FLAG IPs with six-times
1037 the mean value obtained in the control IP). Orange stars: comparison of HeLa and HeLa-
1038 PIH1D2 cells. Single star: p-values <0.05; double stars: p-values < 0.005 (t tests).
1039 D-Assembly of liprin- α 2 complexes by R2SP.
1040

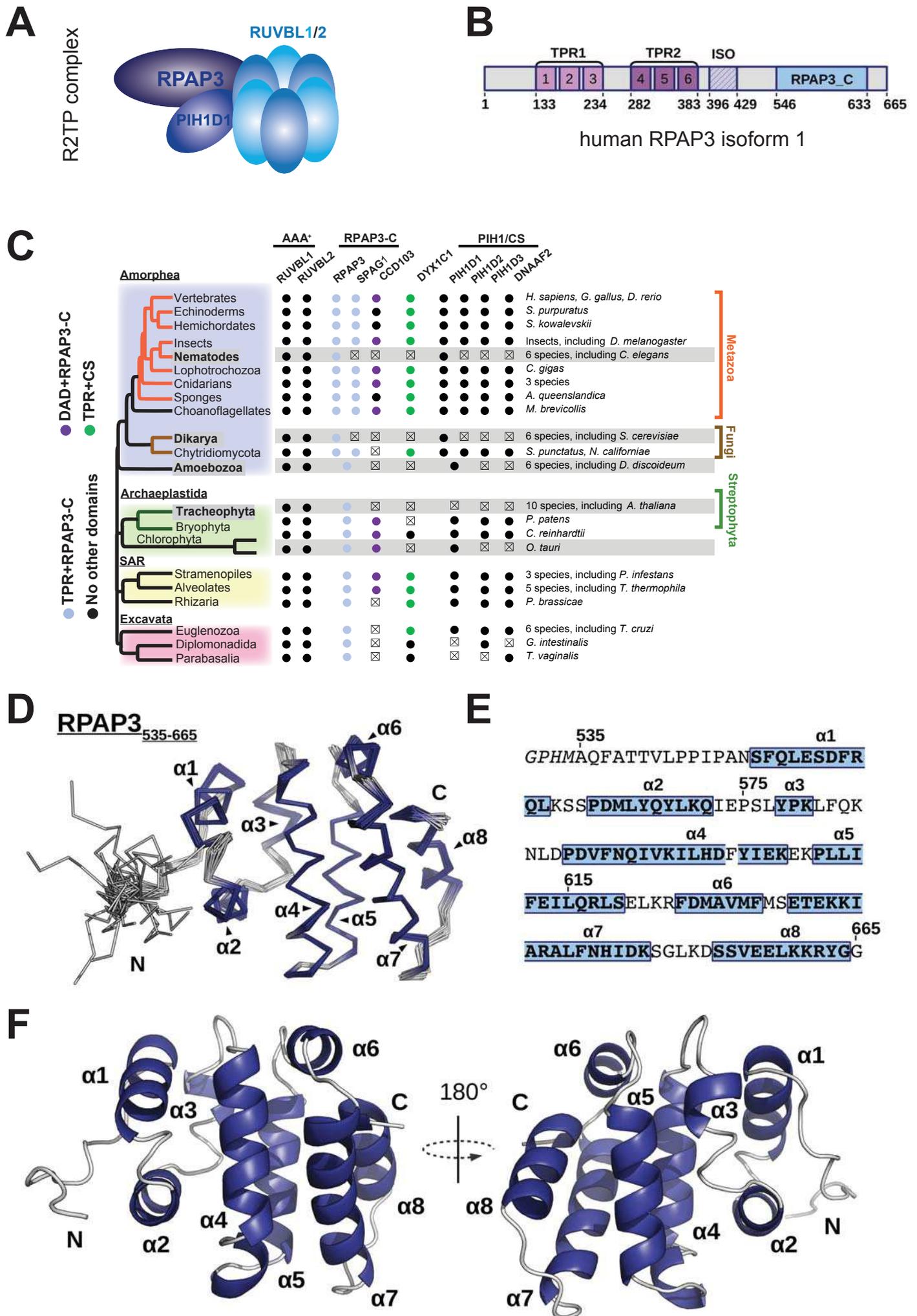
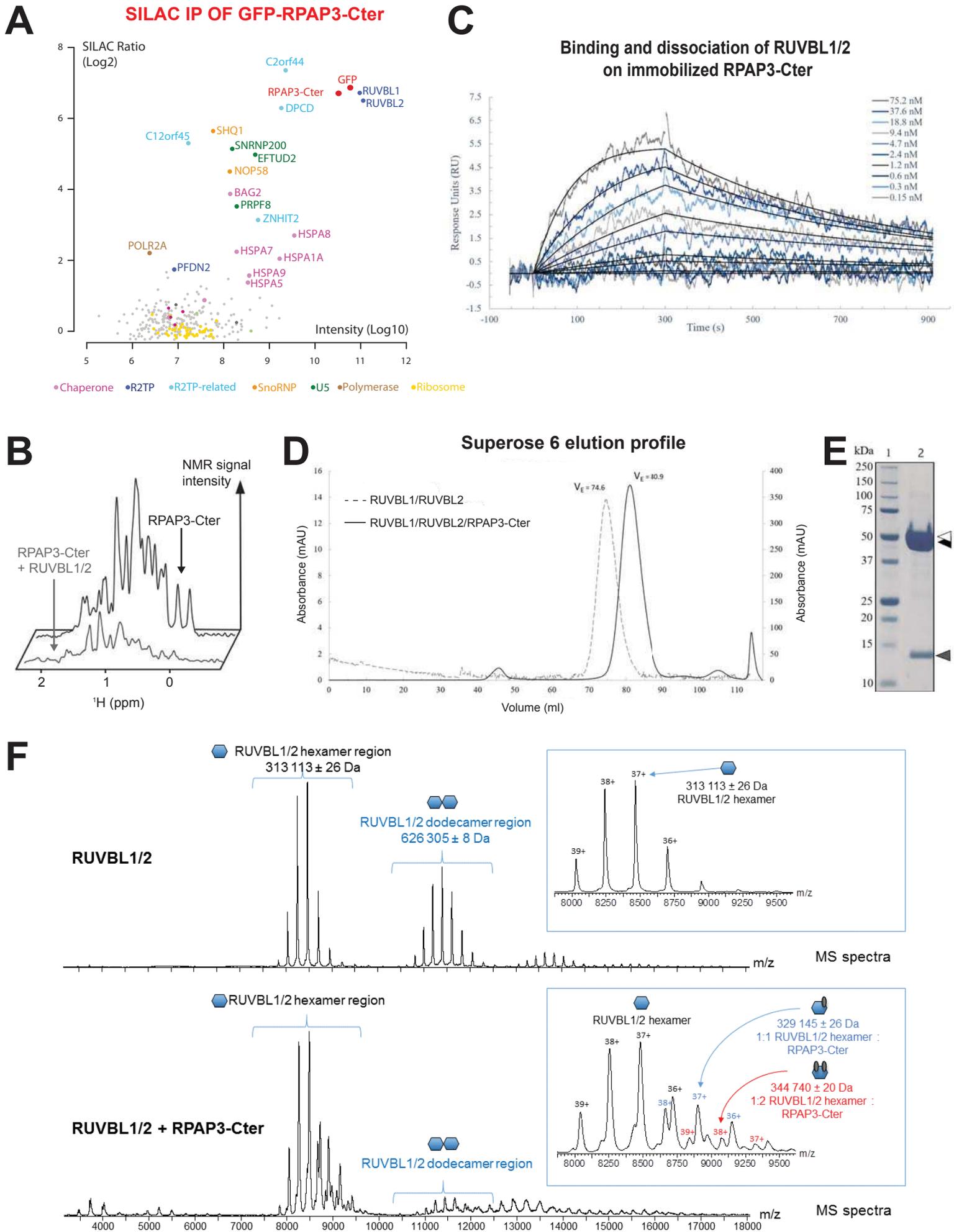
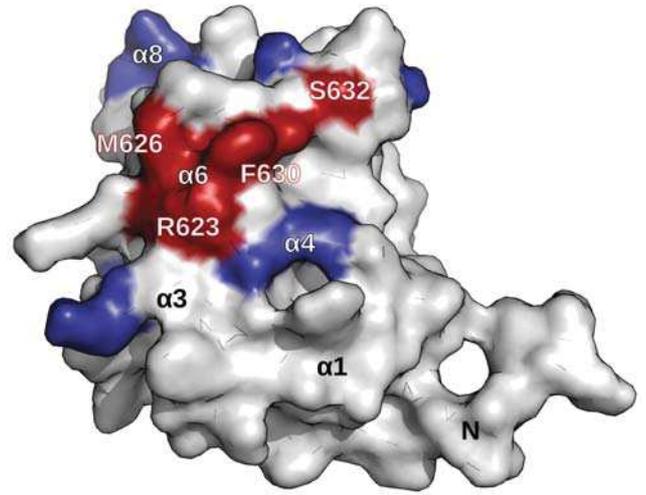
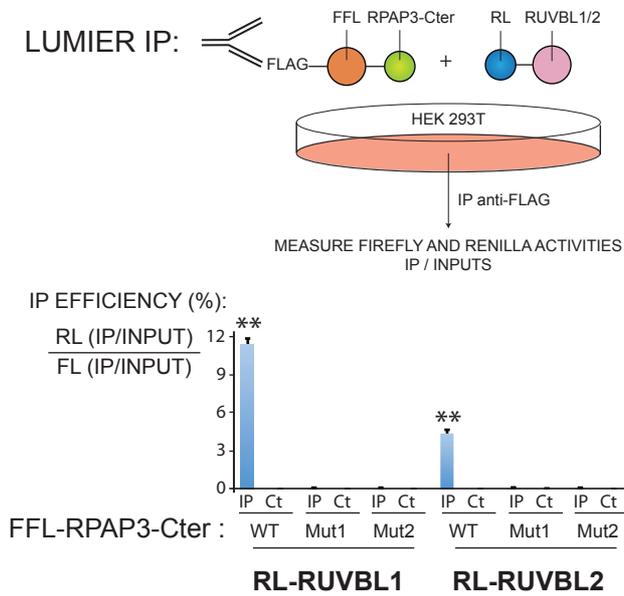
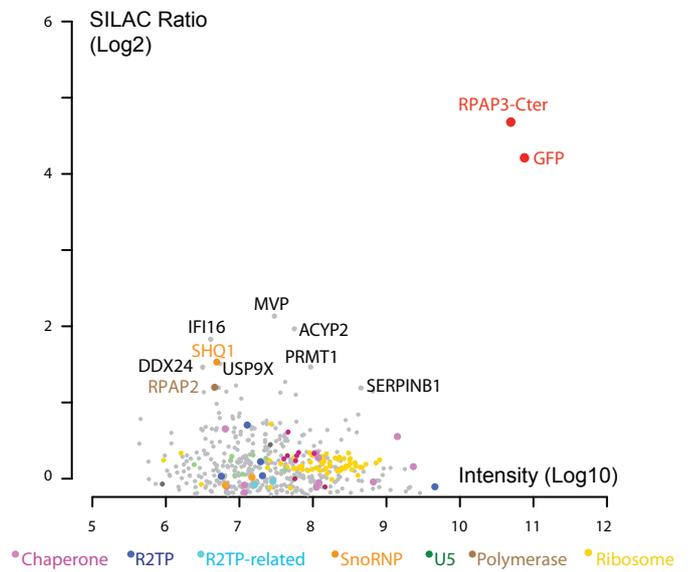
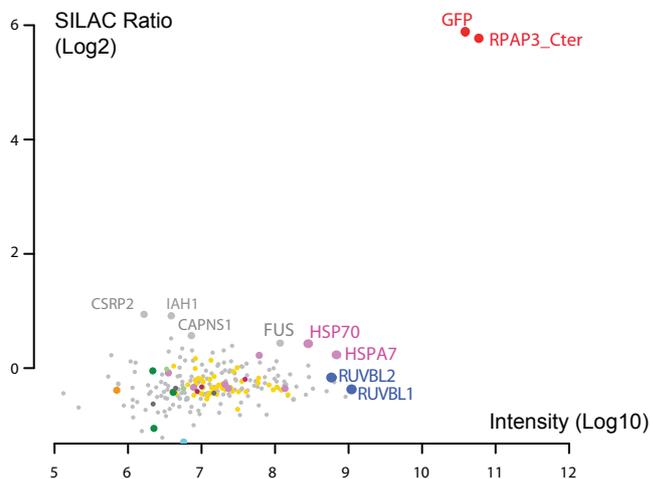


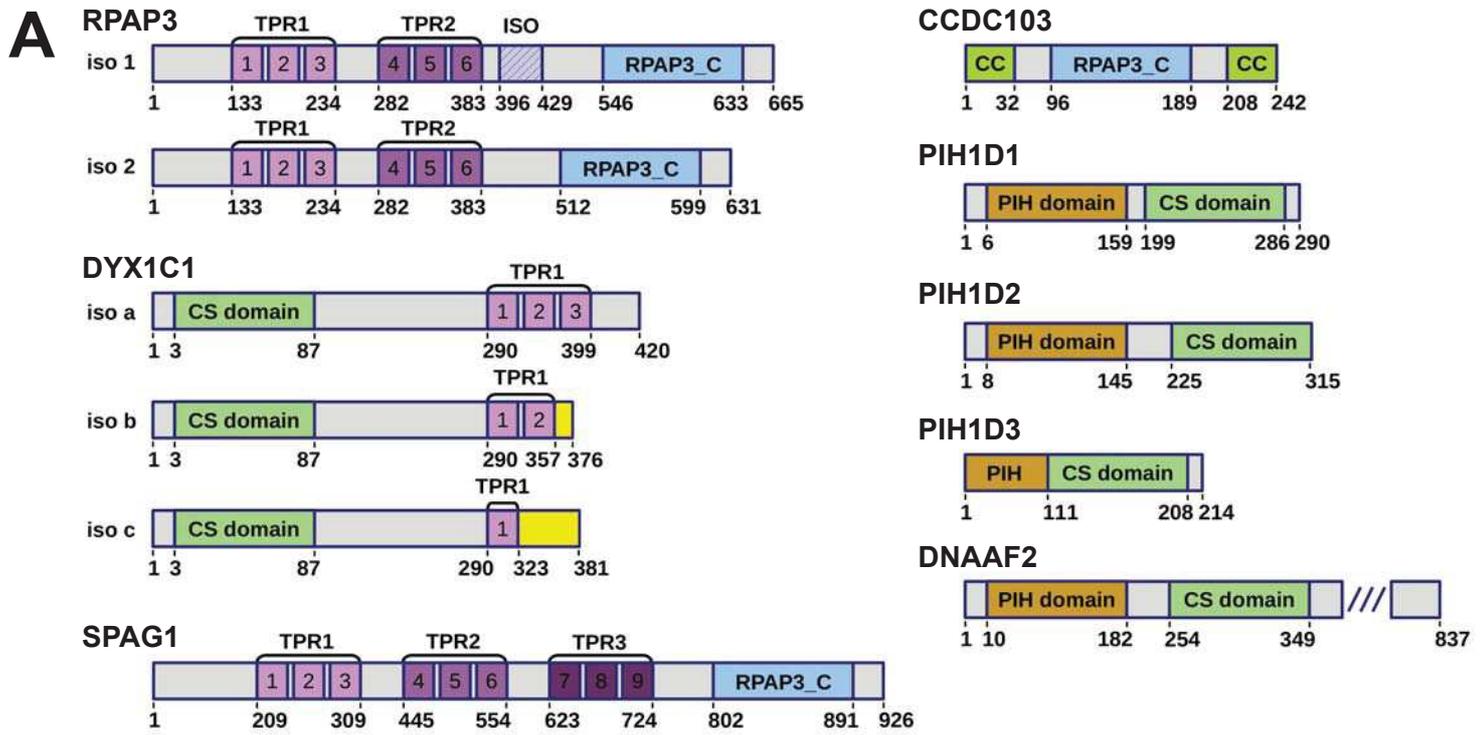
Figure 1



A

	RPAP3 Cter- WT	K584A-D587A- D589A	E604A-K605A- K607A
pACT-RUVBL2	***	**	**
pACT-Alix	-	-	-
	Q616A- R617A	R623A-M626A (Mut1)	F630A-S632A (Mut2)
pACT-RUVBL2	**	-	-
pACT-Alix	-	-	-
	K636A- K637A	E657A-E658A- K660A-K661A	
pACT-RUVBL2	**	**	
pACT-Alix	-	-	

B**C****D****SILAC IP OF GFP-RPAP3-Cter Mut1****E****SILAC IP OF GFP-RPAP3-Cter Mut2****Figure 3**



B

3xFlag-FFL-X

	DYX1C1-iso-a	DYX1C1-iso-b	DYX1C1-iso-c	RPAP3-iso-1	RPAP3-iso-2	SPAG1	CCDC103
HSP70	0.4	0.3	1.2	3.0	1.8	6.7	1.1
HSP90	0.1	0.0	0.3	0.2	0.1	0.7	0.3
STIP1	1.0	0.3	1.9	1.9	1.3	4.8	1.7
PIH1D1	0.0	0.0	0.2	41.0	0.7	0.3	0.1
PIH1D2	0.1	0.0	0.3	0.2	0.2	31.3	0.1
PIH1D3	0.8	0.1	4.2	0.3	0.2	0.8	0.2
DNaAF2	42.1	0.3	0.1	0.3	0.8	7.7	0.1

IP EFFICIENCY : RL (IP/INPUT) / FFL (IP/INPUT) [%]

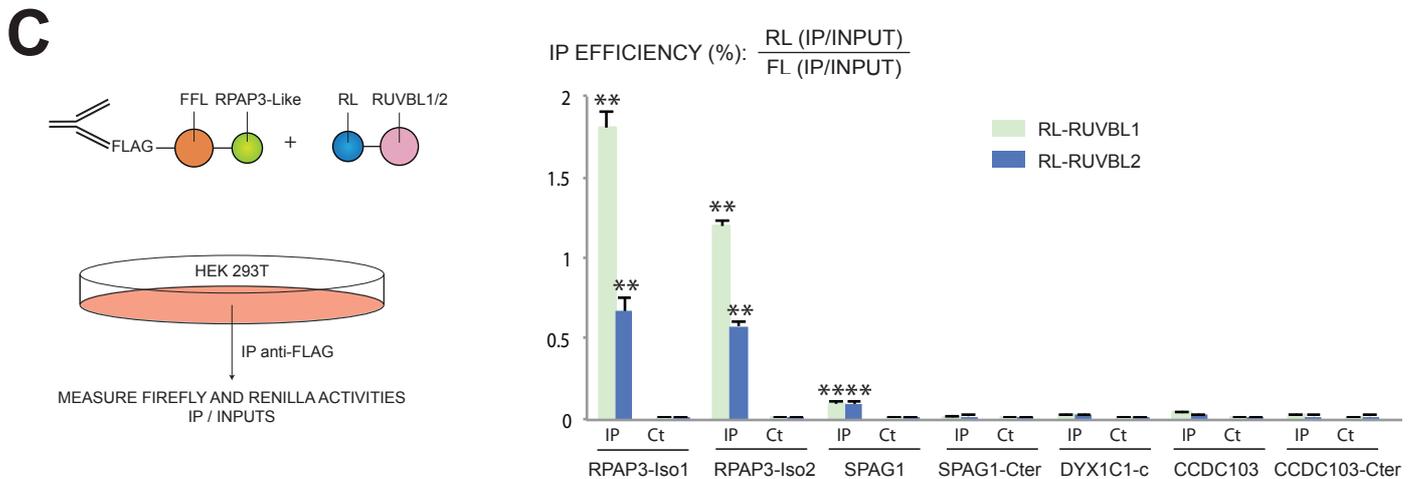
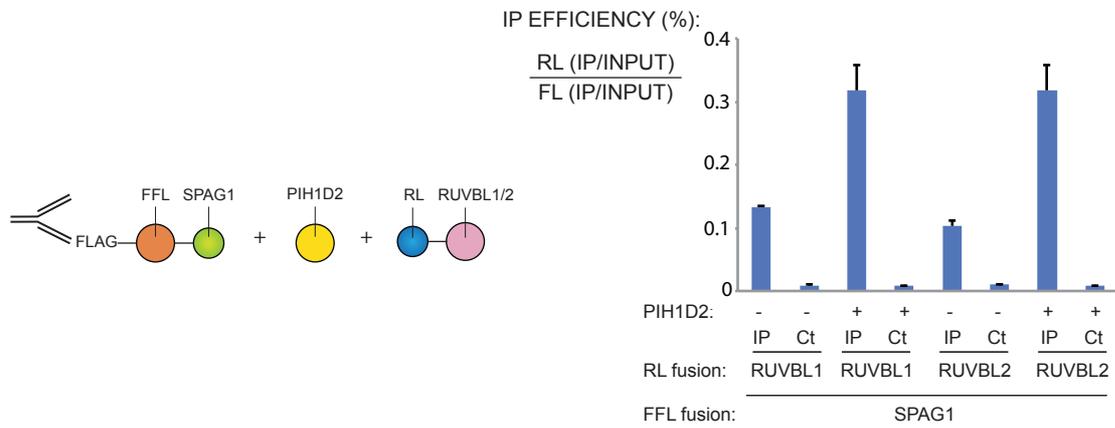
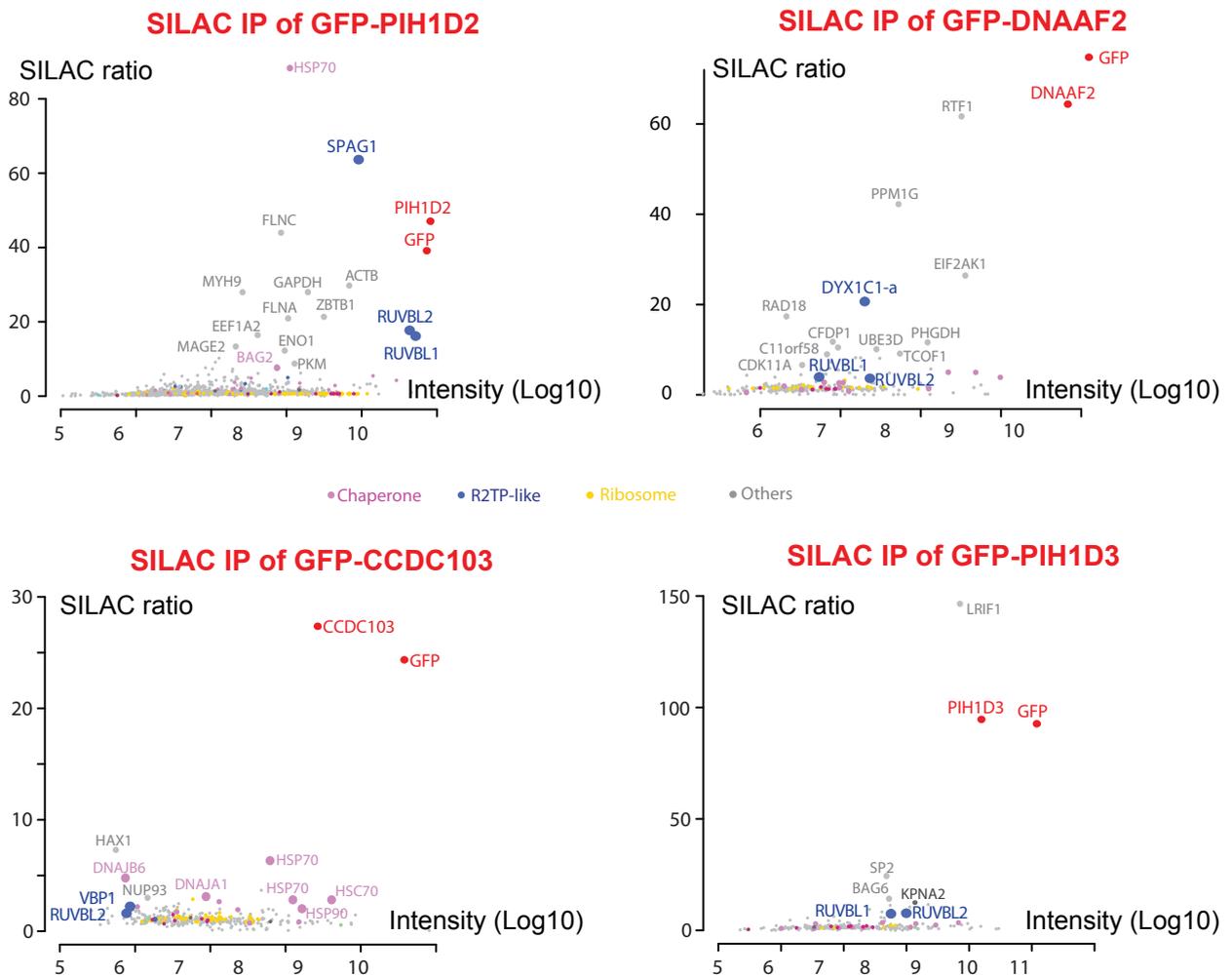
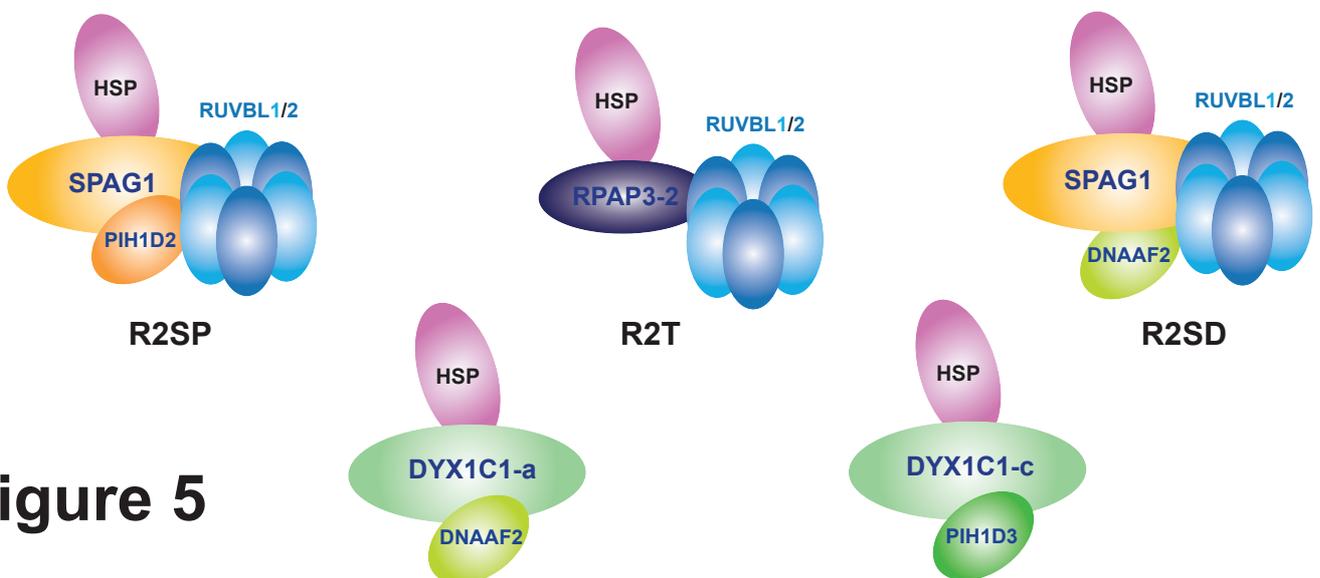


Figure 4

A**B****C****Figure 5**

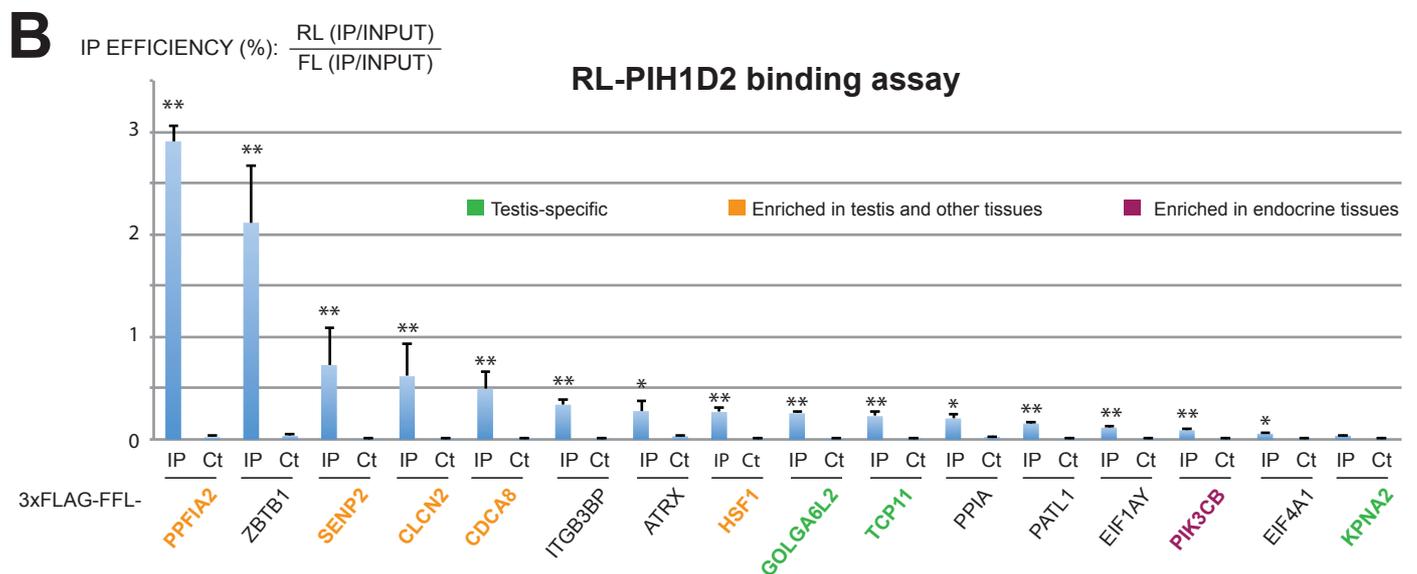
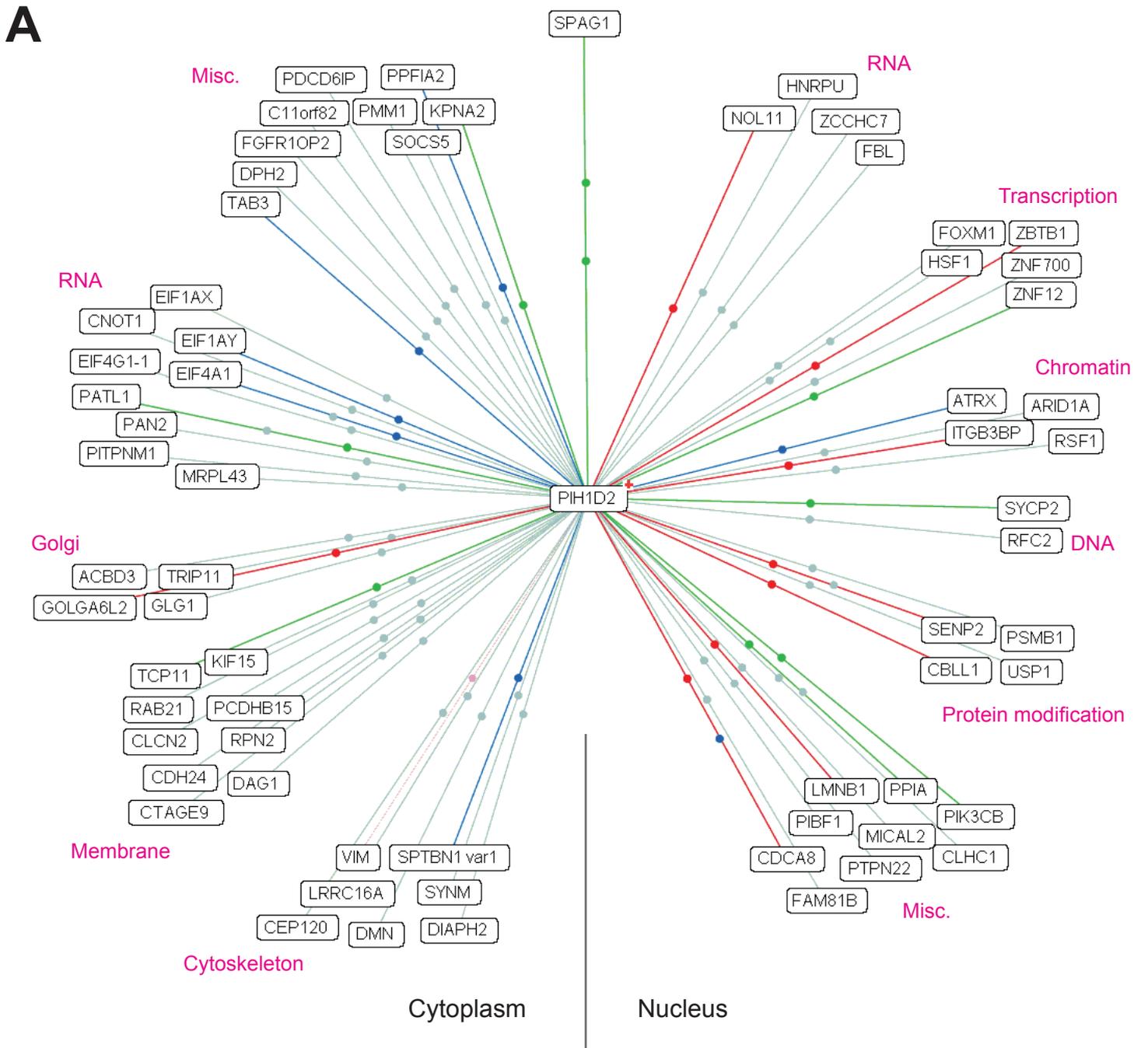


Figure 6

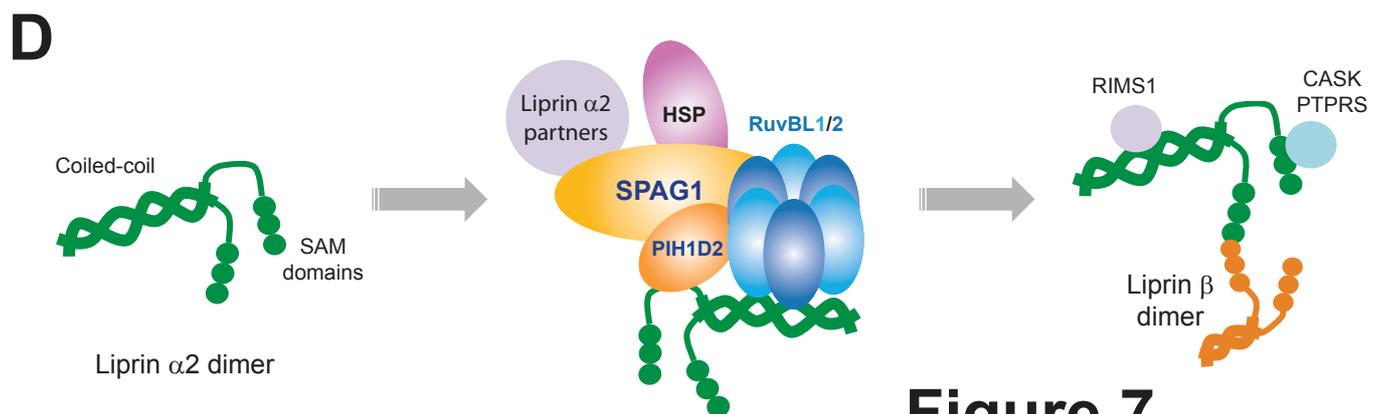
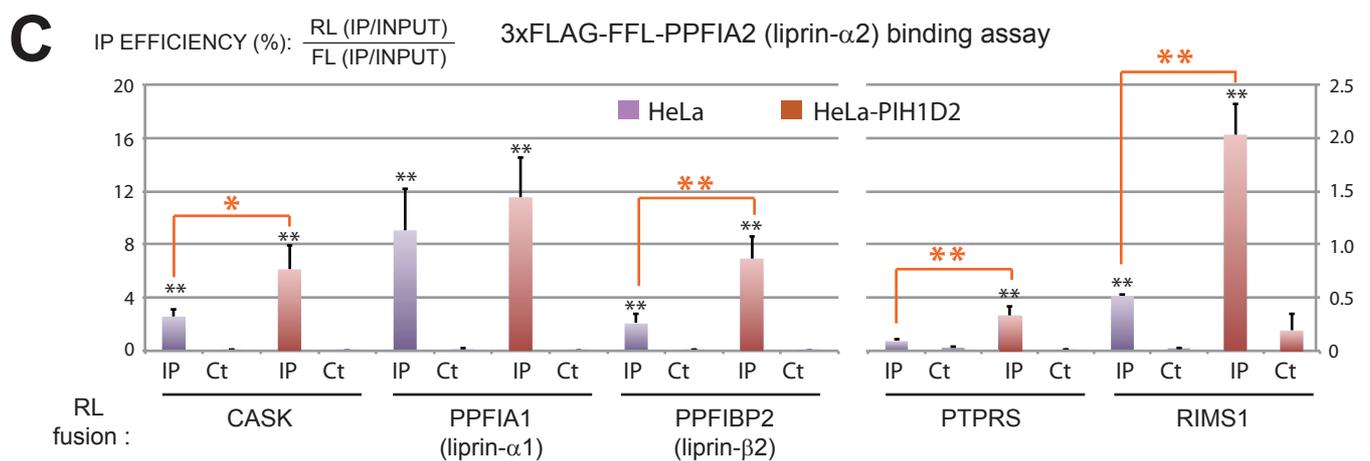
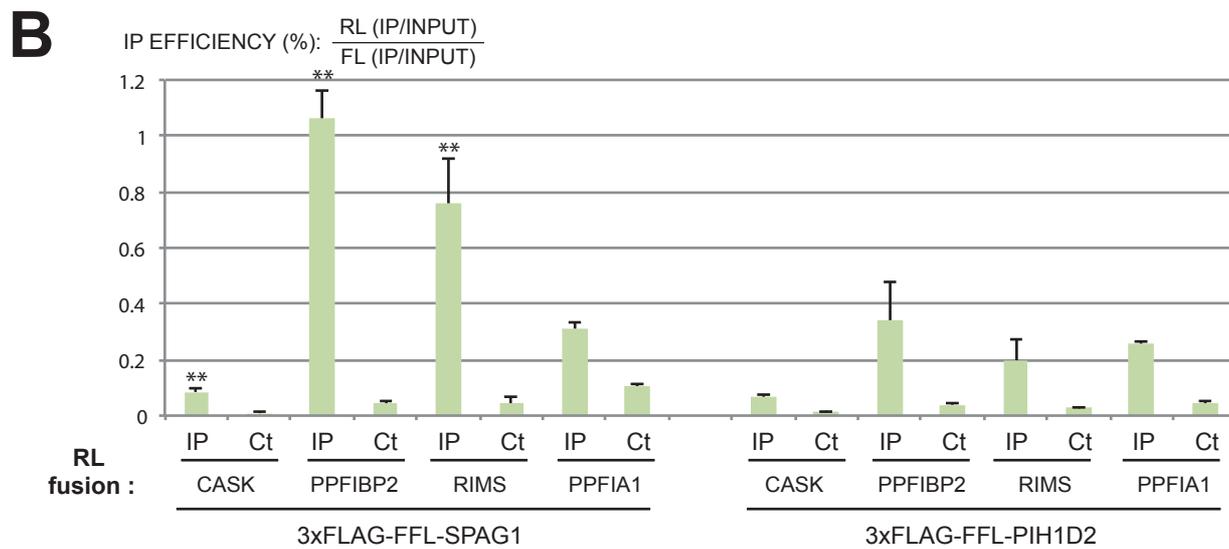
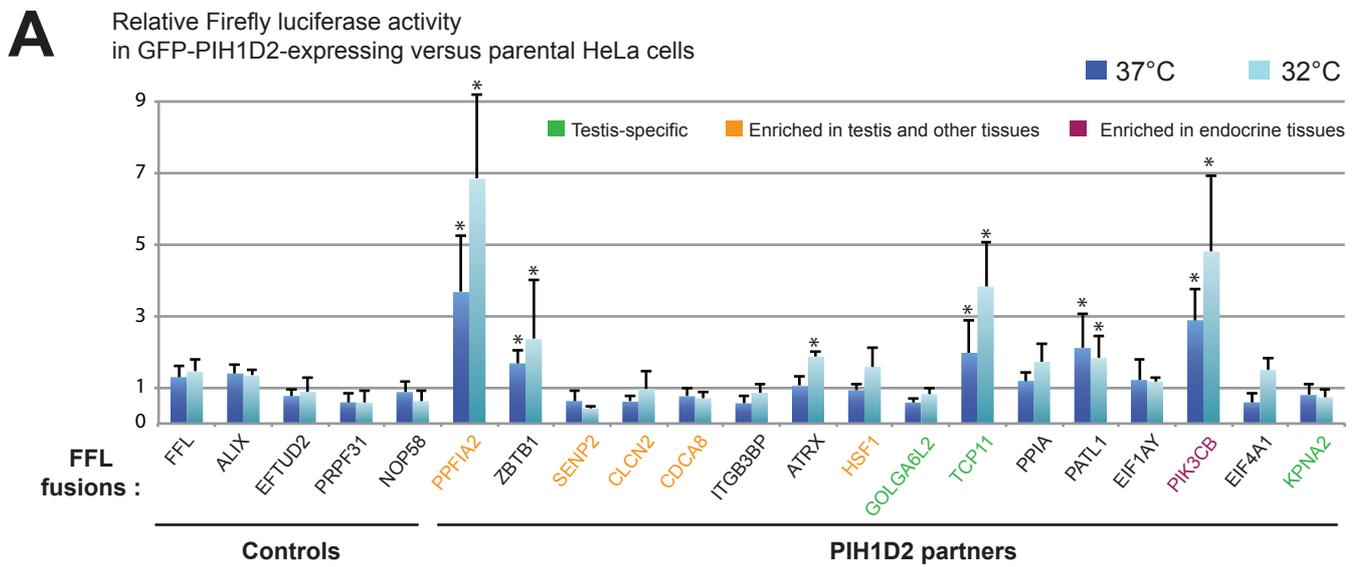


Figure 7

Table 1: NMR statistics.

	RPAP3 ₅₃₅₋₆₆₅
NMR distances and dihedral constraints	
Distance constraints	
Total NOEs	3707
Short range ($ i - j \leq 1$)	1704
Medium-range ($ i - j < 5$)	1033
Long-range ($ i - j \geq 5$)	970
Total dihedral angle restraints	230
ϕ	110
ψ	120
Structure statistics	
Violation occurrences	
Distance constraints ($> 0.2 \text{ \AA}$)	0
Dihedral angle constraints ($> 5^\circ$)	1.30 ± 1.26
Violations	
Mean distance constraints (\AA)	0.10 ± 0.03
Mean dihedral angle constraints ($^\circ$)	6.70 ± 1.94
Max. dihedral angle violation ($^\circ$)	9.99
Max. distance constraint violation (\AA)	0.14
R.m.s. deviations from idealized geometry	
Bond lengths (\AA)	0.013
Bond angles ($^\circ$)	1.8
RMSD to best structure (\AA)	
All backbone atoms	0.98 ± 0.38
All heavy atoms	1.33 ± 0.29
Backbone atoms in secondary structures	0.37 ± 0.05
Heavy atoms in secondary structures	0.94 ± 0.07
Ramachandran statistics	
Residues in most favoured regions (%)	94.3
Residues in additional allowed regions (%)	5.7
Residues in generously allowed regions (%)	0.0
Residues in disallowed regions (%)	0.0

Table 2 – RuvBL1/2:RPAP3-Cter affinity and kinetic interaction parameters determined by SPR

His_RuvBL1_Flag_RuvBL2 interaction with immobilized RPAP3-Cter				
K_D (M)		k_d (s ⁻¹)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	n*
$4,18 \times 10^{-9} \pm 1,96 \times 10^{-9}$		$1,12 \times 10^{-3} \pm 2,58 \times 10^{-4}$	$2,97 \times 10^5 \pm 6,35 \times 10^4$	3

* n- stands for triplicates

III. Discussion

A. Caractérisation de la fonction du domaine C-terminal de RPAP3

La structure du complexe R2TP chez *S. cerevisiae* à basse résolution vient tout juste d'être publiée mais celle du R2TP humain présente toujours des zones d'ombre. Nos données sur le domaine C-terminal de RPAP3 (article n°2) clarifient l'organisation du R2TP humain: RPAP3 C-ter lie directement les RUVBL1/2. D'autre part, on savait que RPAP3 recrutait directement HSP90 *via* ses domaines TPR (Pal et al., 2014; Quinternet et al., 2015) et PIH1D1 par un fragment situé après le TPR2 (données non-publiées de nos collaborateurs). Ceci en fait un élément central, constitutif du R2TP (Figure 35).

De plus, les données sur les interactions dans les extraits cellulaires entre le domaine C-ter de RPAP3 et les RUVBL1/2 nous permettent de préciser le mode de fonctionnement du complexe R2TP et de proposer de nouvelles fonctions pour les RUVBL1/2. Dans le cas des snoRNP à boîtes C/D, on constate que NOP58 est recruté par le domaine RPAP3-Cter (article 2 Figure 2A), alors que le domaine N-ter de PIH1D1 lie SNU13 et la fibrillarine (Malinová et al., 2017). Il en est de même pour les sous-unités des snoRNP à boîtes H/ACA : SHQ1, le chaperon de la dyskérine (et possiblement aussi celle-ci) est recruté par RPAP3-Cter tandis que NHP2 lie le domaine PIH de PIH1D1. Ceci suggère que, pour assembler les snoRNP, le R2TP recrute de manière indépendante, les différentes sous-unités concernées. Ces sous-unités seraient stabilisées par HSP90 puis remodelées par RUVBL1/2 (Figure 35).

Les fonctions des domaines N-terminal et C-terminal de RPAP3 sont encore méconnues. Les expériences *in vitro* de nos collaborateurs montrent que le domaine C-terminal interagit directement et de façon très stable avec les protéines AAA+ ATPase RUVBL1/2 sous forme dodécamérique (deux hétéro-hexamères superposés) (article 2, Figure 2 B, C). L'absence d'interaction des clients dans les mutants du domaine RPAP3 C-ter n'interagissant plus avec RUVBL1/2 suggère que ces clients sont liés à RPAP3 *via* RUVBL1/2. Le rôle exact de ces AAA+ ATPases reste encore incompris. Le domaine RPAP3-Cter pourrait maintenir les RUVBL (sous forme RUVBL-Apo ou RUVBL-ADP) dans une conformation favorable à leur aux substrats. La forme liée à l'ATP (mutant E->Q), qui ne lie plus RPAP3 (article n°2, Figure 2 D) pourrait être une forme activée des RUVBL, dans laquelle elles interagiraient uniquement avec leurs substrats. Le rôle de RPAP3, sur le modèle HOP, serait de maintenir les RUVBL dans une conformation ouverte pour recruter les substrats, après leur stabilisation par HSP90. L'arrivée de l'ATP déplacerait RPAP3 tandis que l'hydrolyse d'ATP provoquerait une dissociation de l'hétéro-hexamère de RUVBL. Cette dissociation induirait un changement de conformation du substrat.

Cela expliquerait que, en biochimie, on détecte plus facilement l'interaction des substrats avec RUVBL1/2 qu'avec RPAP3/PIH1D1.

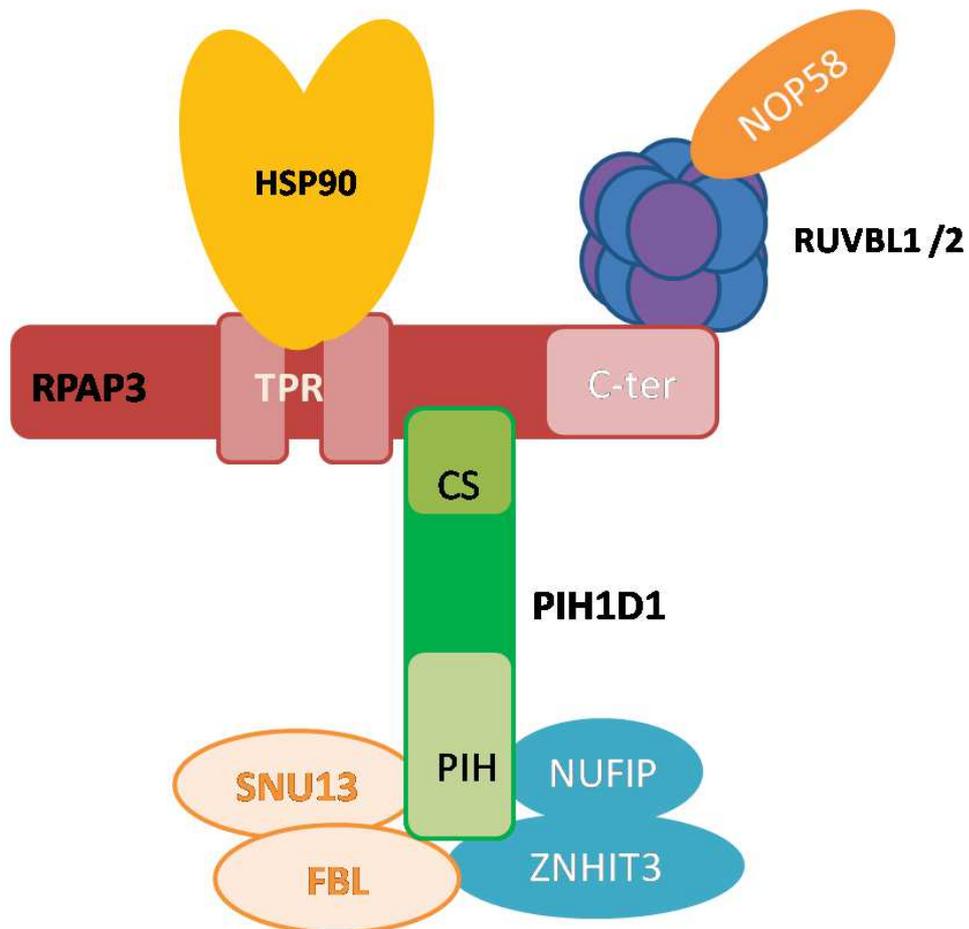


Figure 36 : Représentation des interactions au sein du R2TP au cours de l'assemblage des snoRNP à boîtes C/D

RPAP3 lie HSP90 grâce à son domaine TRP, PIH1D1 via un fragment situé après le TPR2, et RUVBL1 et 2 par son domaine C-terminal.

L'hétéro-hexamère de RUVBL1 et RUVBL2 lie le substrat NOP58, une protéine des snoRNP à boîtes C/D. PIH1D1 lie la fibrillarine (FBL) et SNU13, grâce à son domaine N-terminal (domaine PIH), d'autres protéines des snoRNP à boîtes C/D. Enfin, PIH1D1 fixe RPAP3 par son domaine C-terminal appelée domaine CS.

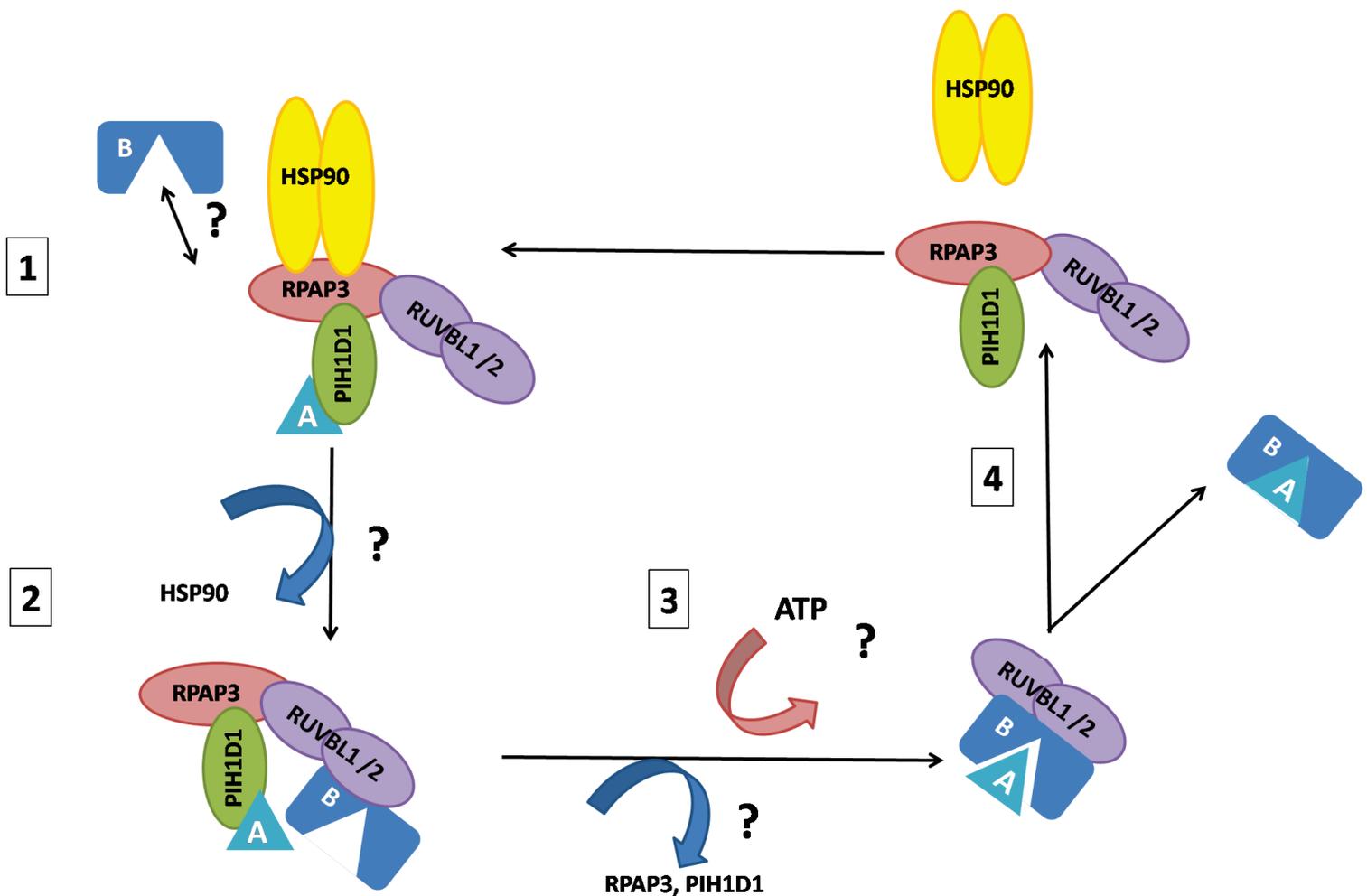


Figure 37 : Assemblage des complexes macromoléculaires par le R2TP

1) HSP90 s'occuperait du repliement de certaines sous-unités ici (B) qu'elle présente au complexe R2TP. Le R2TP prend en charge directement une autre catégorie de sous unité (A) via PIH1D1. RUVBL1 et RUVBL2 seraient maintenues en conformation apo par RPAP3 par son domaine C-terminal pour favoriser l'interaction avec les substrats. 2) L'interaction entre RPAP3 et HSP90 permettrait le chargement des sous unités B sur les ATPases. Le substrat livré, HSP90 serait libérée. 3) A l'arrivée de l'ATP, RPAP3 et PIH1D1 quitteraient le R2TP. Les RUVBL1/2 assureraient l'incorporation des substrats ainsi que le changement de conformation nécessaire grâce à l'hydrolyse de l'ATP. 4) RUVBL1/2 lié à ADP ou apo et le complexe AB nouvellement assemblé se dissocieraient. Les ATPases seraient alors recyclées pour reformer du R2TP. Certaines étapes restent encore à élucider.

B. Mise en évidence d'un nouveau complexe tissu-spécifique, le R2SP, apparenté au R2TP

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'organisme humain possède d'autres protéines similaires à RPAP3 et PIH. Nous n'avons pu mettre en évidence que certaines paires d'interactions telles que SPAG1-DNAAF2 mais pas de complexe avec les RUVBL1/2. Certaines de ces protéines sont peu ou pas exprimées dans les cellules HeLa, ce qui peut expliquer les différences des résultats obtenus par protéomique SILAC (où seule la proie est surexprimée) et les tests d'interactions LUMIER (où les deux partenaires sont co-exprimés). Les ARNm de DNAAF2 et de SPAG1 dans les cellules HeLa sont exprimés à des niveaux similaires. Dans les expériences d'IP SILAC en cellules HeLa, cependant, nous ne détectons pas DNAAF2 dans les IP de SPAG1. La formation de cette paire dépend peut-être des conditions de culture ou des cellules utilisées. Notons aussi que les cellules HeLa, dépourvues de cil, ne sont sans doute pas le meilleur système pour étudier des protéines impliquées dans la ciliogénèse. Cependant, ce système nous permet de comparer les résultats d'IP entre des protéines exprimées dans des tissus différents. L'idéal serait de disposer d'un système cellulaire cilié et compatible avec le protocole d'IP SILAC.

L'étude en protéomique de PIH1D2 nous a permis de confirmer l'existence d'un nouveau complexe d'assemblage: le R2SP. R2SP semble fonctionner sur le même modèle que le R2TP. L'autre fait intéressant est la tissu-spécificité de ce complexe. En effet, SPAG1 et PIH1D2 sont tous les deux exprimés dans les testicules. Grâce au crible de double hybride et à des expériences en cellules, nous avons mis en évidence un substrat du R2SP : la Liprine $\alpha 2$. PIH1D2 n'avait pas été mis en évidence dans des ciliopathies, contrairement à son partenaire SPAG1. L'assemblage de la Liprine $\alpha 2$ avec ses partenaires montre que la fonction du R2SP n'est pas limitée à la ciliogénèse.

Certains tissus présentent des conditions de températures, ou de pH particulier qui pourrait nécessiter l'aide de complexes d'assemblage spécifiques. Ainsi, le R2SP semble plus efficace sur la Liprine $\alpha 2$ à 32°C qu'à 37°, soit à la température des testicules.

HSP90 α est induite sous l'influence de stress comme les chocs thermiques, et sa délétion engendre notamment un défaut de la spermatogénèse (Grad et al., 2010). Il est possible que cette chaperonne soit associée à un complexe de type R2TP dans cet organe pour assembler des complexes macromoléculaires ou les dynéines du flagelle des spermatozoïdes nécessaires au déroulement de la spermatogénèse.

C. Ciliogenèse motile et les complexes apparentés au R2TP

Les protéines de type RPAP3 et PIH avaient toutes été mises en cause dans des maladies liées à la ciliogénèse (sauf Pih1D2, exempt de publication), et plus particulièrement dans l'assemblage des dynéines des cils (Dong et al., 2014; Knowles et al., 2013; Omran et al., 2008; Panizzi et al., 2012; Tarkar et al., 2013). D'autre part, les données d'immunofluorescence montrent une localisation cytoplasmique, hors du cil, pour la plupart de ces protéines (Tarkar et al., 2013). Le modèle que nous proposons est que ces complexes R2TP-like sont impliqués dans l'assemblage de dynéines dans le cytoplasme, avant leur adressage aux cils. De fait, quelques études ont dressé un parallèle entre la base du cil motile et les pores nucléaires (McClure-Begley et Klymkowsky, 2017; Torrado et al., 2016). Le modèle d'action de ces nouveaux complexes (dont le R2SP) pourrait ressembler à celui proposé pour l'assemblage de l'ARN polymérase II par le R2TP: les sous unités de l'ARN polymérase II sont assemblés par le R2TP dans le cytoplasme, le complexe mature migre ensuite vers le noyau pour accomplir sa fonction (Figure 23). Il est possible que le R2SP ait aussi des substrats impliqués dans la ciliogénèse : le R2SP aurait des substrats différents suivant les tissus. Les autres complexes de type R2TP semblent impliqués dans des ciliopathies mais pourraient l'être aussi dans d'autres processus. La mise en évidence de protéines similaires à RPAP3 questionne sur la redondance fonctionnelle de ces protéines. SPAG1 est, d'après les banques de données, exprimé dans l'intestin, tout comme DYX1C1 (<https://www.proteinatlas.org>) mais, dans notre modèle murin d'inactivation de RPAP3, il ne semble pas y avoir de compensation. Ces données suggèrent que les différents « R2TP-like » ont chacun des substrats spécifiques.

Il est donc important d'arriver à mieux les caractériser pour mieux les comprendre tout comme le R2TP.

Notre étude ouvre donc des perspectives sur la fonction des RVBL1 et 2 qui ont trouvé ici de nouveaux partenaires, mais aussi sur la compréhension du mode d'action du R2TP et des complexes associés.

D. Rôle de RPAP3 dans le maintien des cellules prolifératives de l'épithélium intestinal et de la voie Wnt

Nos résultats chez les souris *Vil-Cre-ERT2; RPAP3^{flox/flox}* montrent que RPAP3 est essentiel pour la prolifération des CBC et du TA. Nous cherchons à savoir si ce phénotype intrinsèque aux cellules souches CBC. L'absence de phénotype visible par coloration HE sur l'épithélium dans le modèle d'inactivation de RPAP3 dans les CBC (*Lgr5-GFP-IRES-CreERT2*) peut s'expliquer par la l'expression mosaïque de cette construction (Barker et al., 2007). Une autre explication est que

les cellules CBC ne sont pas irremplaçables (H. Tian et al., 2011) ainsi si elles sont éliminées par la délétion de *RPAP3*, les progéniteurs situés dans le TA ou les cellules "+4" prendront le relai afin de préserver l'intégrité de l'épithélium. Lorsque la Cre est sous contrôle du promoteur de la Villine, toutes les cellules de l'épithélium sont touchées donc la compensation ne peut pas avoir lieu. Nous montrons ici un rôle potentiel de *RPAP3* dans la prolifération cellulaire, ceci supporté aussi par le fait que les cellules de Paneth, qui ont un temps de renouvellement plus long que les autres cellules de l'épithélium, ne sont pas affectées. Ces données amènent aussi à se demander si les cellules 4+, qui sont des cellules quiescentes, sont elles aussi affectées par la délétion de *RPAP3* ou non. *RPAP3* serait nécessaire au maintien de toutes les cellules souches en préservant leurs caractéristiques. Il est important de comprendre la cascade d'événements aboutissant au phénotype drastique observé dans l'épithélium intestinal.

RUVBL1/2 ont été décrites comme interagissant physiquement avec la β caténine (Bauer et al., 1998, 2000). Si le R2TP assure l'assemblage des complexes régulateurs de la transcription de la voie Wnt, les *RUVBL* auraient pour rôle de recruter ces protéines et de modifier leur conformation pour mieux les insérer dans le complexe. Le phénotype observé ressemble à celui décrit pour la délétion de *TCF4*, qui code pour un cofacteur transcriptionnel de la β -caténine (van Es, Haegbarth, et al., 2012). La délétion du gène d'un autre cofacteur de cette voie, *BRG1* (aussi appelé *SMARCA4*), dans toutes les cellules épithéliales (avec la *VilCreER^{T2}*) entraîne lui aussi une perte des cellules souches ainsi que du TA, proche de mes observations (Holik et al., 2013). *BRG1* est une unité centrale d'un complexe remodeleur de la chromatine appelé *BRG1/BAF* de la famille de *SWI/SNF* (W. Wang et al., 1996). Ces complexes sont recrutés par des facteurs de transcription aux promoteurs de gènes pour permettre une transcription efficace par la polymérase II. Plusieurs études ont montré que *BRG1* était nécessaire à l'activation transcriptionnelle par la β -caténine (N Barker et al., 2001; Park et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que le R2TP pourrait assembler le complexe associé à *BRG1* ou l'interaction entre β caténine/*BRG1/TCF4*. Une fois assemblé dans le cytoplasme les partenaires migreraient vers le noyau au promoteur des gènes cibles de la voie Wnt.

TRRAP (une *PIKK*) est une des sous unités des complexes co-transcriptionnels *SAGA* et *TIP60*, dont font également partie les protéines *RUVBL1* et *RUVBL2*. *TRRAP*, comme els autres *PIKK*, est assemblée avec ses partenaires par le R2TP *via* *TELO2* ((Takai et al., 2010) et nos résultats non-publiés). Chez la drosophile, il a été montré que l'homologue de *TRRAP* (*Nipped-A*), était nécessaire à la prolifération des cellules souches intestinales (Tauc et al., 2017). Bien que la drosophile et la souris soient des organismes assez différents, il est possible que le rôle de *TRRAP*, cible du R2TP, soit aussi conservé chez la souris. Ceci suggérerait que *SAGA* ou *TIP60* soient recrutés par la β -caténine pour activer la transcription de ses gènes cibles. L'absence de

RPAP3, empêchant l'assemblage de SAGA et TIP60, entraînerait la perte des cellules souches intestinales.

E. Rôle de RPAP3 dans l'épithélium du côlon

Curieusement, l'épithélium colique est affecté plus tardivement que l'intestin. Il a déjà été suggéré que la *VilCreER^{T2}* était moins pénétrante dans le côlon que dans l'intestin grêle, le phénotype serait donc moins tranché. Cela pourrait aussi s'expliquer par une cinétique différentielle de renouvellement de l'épithélium du côlon par rapport à l'intestin grêle. Le renouvellement de l'épithélium colique se ferait en 5 à 7 jours contre 3 à 5 jours pour l'intestin (Nick Barker, 2014). Cela peut varier en fonction des agressions par les pathogènes et agents extérieurs présents dans la lumière intestinale. Une troisième hypothèse serait une sensibilité différentielle du côlon par rapport à l'intestin grêle. Ainsi, Holik et ses collaborateurs observent que la délétion de BRG1 entraîne un phénotype drastique dans l'intestin grêle et rien d'apparent dans l'épithélium du côlon. Cela s'explique par l'expression dans le côlon de Brahma (Brm), un homologue de BRG1 capable de compenser sa perte (Holik et al., 2013). Si on suppose que nos observations s'expliquent par un effet de R2TP sur l'assemblage de BRG1 avec TCF4 et β caténine, Brahma pourrait compenser l'absence de BRG1 au niveau du côlon et sauver le phénotype de prolifération *via* la voie Wnt. Ce modèle sous-entend que Brahma ne serait pas substrat de R2TP.

Dans un premier temps, je vais vérifier le rôle de RPAP3 sur la voie Wnt. Pour ce faire, afin d'adresser la question d'un point de vue moléculaire, nous utiliserons le système TOP/FOP dans des lignées cellulaires de type HCT116 (une lignée humaine d'origine tumorale colique) modifiées par CRISPR – Cas9 où la délétion de RPAP3 peut être induite par une dose d'auxine ou par siRNA. Dans ce système, l'activation de la voie Wnt induit l'expression de la GFP sous rapporteur TOP, alors que des mutations dans le rapporteur FOP permettent de mesurer le niveau basal de fluorescence. Avec cette expérience, nous pourrions vérifier si RPAP3 affecte ou non l'activité de la voie Wnt.

Le phénotype observé dans le côlon à jour 17 pourrait résulter de la déstabilisation d'un autre substrat du R2TP, par exemple mTOR. mTOR est connu pour jouer un rôle dans la prolifération cellulaire. En fait, mTOR semble surtout jouer un rôle dans la régénération de l'épithélium intestinal : sa délétion constitutive dans l'épithélium intestinal n'est pas létale (Sampson, Davis, Grogg, & Zheng, 2016). Plusieurs études ont montré l'implication de mTOR dans la différenciation des cellules de Paneth mais aussi des cellules à mucus (Sampson et al., 2016; Yilmaz et al., 2012; Y. Zhou, Rychahou, Wang, Weiss, & Evers, 2015). De plus, cette régulation se ferait *via* la voie de signalisation de Notch (Yilmaz et al., 2012; Y. Zhou, Rychahou, Wang, Weiss, & Evers, 2015). Un des phénotypes de l'inhibition de la voie Notch est la

différenciation massive des cellules progéniteurs en cellules sécrétrices de type cellules à mucus (H. Tian et al., 2015). Nos données montrent une perte de la prolifération sans différenciation massive. L'effet de *RPAP3* sur le maintien des CBC et du TA ne semble donc passer ni par la voie Notch ni par mTOR dans l'intestin grêle. Cependant, à jour 17, il semble qu'il y ait une augmentation du nombre de cellules à mucus dans le côlon. Nous attendons le marquage PAS pour confirmer l'observation faite en HE. Si elle est avérée, la délétion de *RPAP3* pourrait affecter des voies de signalisation différentes dans l'intestin et dans le côlon. Cependant l'effet que nous observons pourrait aussi bien être dû à un substrat encore inconnu du R2TP. Nous avons découvert récemment dans nos études de protéomiques du domaine N-ter de PIH1D1 de nouvelles protéines qui n'étaient pas encore caractérisées comme des clients du R2TP.

F. Régénération de l'épithélium intestinal après l'inactivation de *RPAP3*

La régénération de l'épithélium visible à jour 17 pourrait s'expliquer par les cryptes résiduelles, visibles à jour 10. Ainsi les premiers jours, lorsque l'épithélium est détruit, ces souris puiseraient dans leurs réserves jusqu'à la régénération de l'épithélium. Le renouvellement se régénérant en quelques jours, 7 jours après l'état critique, l'épithélium pourrait être opérationnel. Cela expliquerait la chute de poids jusqu'à jour 10 puis la remontée progressive, peut être au fur et à mesure que l'épithélium se renouvelle. Cependant, le tissu observé à jour 17 ne semble pas être un tissu normal. Les villosités sont dédoublées, certaines cryptes semblent se superposer. Cette régénération semble désorganisée. Je vais procéder à des marquages anti-*RPAP3* pour vérifier si cette architecture anarchique est due à une régénération par des cellules souches où *RPAP3* n'aurait pas été oblitéré (« escapers »). Si *RPAP3* n'est pas détecté dans ces cryptes, cela suggère que certaines cellules souches se sont affranchies de la dépendance à *RPAP3*. Cela pourrait expliquer la prolifération désorganisée, *RPAP3* permettant un contrôle de la prolifération.

Chez *S.cerevisiae*, le mutant Tah1 n'est pas létal, son homologue chez *D. melanogaster*, Spaghetti, est essentiel pour le développement larvaire mais pas pour l'organisme adulte. Chez la souris *RPAP3* est nécessaire au stade embryonnaire et chez l'adulte. Mes expériences en biochimie montrent un rôle central de *RPAP3* au fur et à mesure que la complexité de l'organisme augmente.

G. La perte d'une copie de *RPAP3* favoriserait la tumorigénèse

Nos expériences d'induction génétique de la tumorigénèse colorectale et intestinale présentent beaucoup d'hétérogénéité interindividuelles mais aussi entre les différentes expériences, rendant l'analyse plus délicate. Cependant nous avons pu dégager des tendances. Chez les souris *VilCreERT2 ; RPAP3^{flxed/+} ; APC^{flxed/+}*, il y aurait plus d'adénomes que chez les

souris contrôles *VilCreERT2 ; RPAP3^{+/+} ; APC^{floxed/+}*. En revanche, ces adénomes seraient de tailles inférieures à ceux détectés chez les contrôles. La délétion d'une copie de *RPAP3* favoriserait l'apparition des adénomes mais limiterait leur croissance. Cette tendance est à confirmer par de nouvelles expériences avec plus d'animaux contrôles.

Une de nos hypothèses serait qu'une baisse de la quantité de complexe R2TP pourrait déséquilibrer l'assemblage des machineries clientes. Comme les PIKK font partie de ces clients, il est possible que la délétion de *RPAP3* entraîne une diminution de leur fonction, notamment ATR, ATM et DNA-PKcs, impliquées dans la réparation de l'ADN. Dans notre cas, le système de réparation des cassures de l'ADN serait moins efficace, favorisant l'apparition de mutations et la transformation cellulaire. De fait, 6% des patients présentent une mutation inactivatrice d'ATM (Muzny et al., 2012). Une fois les cellules transformées, la délétion de *RPAP3* provoquerait une baisse de mTOR et une diminution de l'activité de la voie Wnt, ce qui ralentirait la prolifération des cellules transformées et limiterait la taille des adénomes. Dans un premier temps, *RPAP3* serait donc un frein à la tumorigénèse puis il soutiendrait la croissance tumorale.

Dans les expériences d'induction chimique AOM/DSS, les tissus des animaux contrôles et d'intérêt sont tous affectés. Il nous faut définir une stratégie d'analyse pour pouvoir mieux les considérer. Une des solutions seraient de classer selon la gravité, le grade des tumeurs et l'occurrence plutôt que la surface. Nos premières analyses basées sur les surfaces suggéraient des hyperplasies plus importantes chez les animaux *VilCreERT2 ; RPAP3^{floxed/+}* que chez les contrôles, mais cette tendance n'est pas significative. Les coupes sont en cours d'analyse.

L'importance de ce projet repose aussi sur le fait qu'il y a peu de modèle murin de co-chaperons d'HSP90. Les inhibiteurs d'HSP90 engendrent des effets anti-tumoraux mais aussi oncogéniques notamment *via* la déstabilisation des kinases. Ce modèle d'inactivation *in vivo* nous permet de restreindre notre étude à un sous-groupe de substrats de HSP90. Cependant, même au niveau du R2TP, l'activité du complexe apparaît pléiotropique : importante pour la prolifération et le maintien de la voie Wnt, nécessaire pour limiter l'apparition de mutations potentiellement oncogéniques, impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire par mTOR et TSC. Il est donc important de poursuivre les études moléculaires et physiologiques en parallèle car elles sont complémentaires pour comprendre les phénotypes observés.

IV. Perspectives

A. R2TP, complexes apparentés R2TP-like et ciliogénèse

Il nous reste à comprendre comment le R2TP choisit les substrats pour former les bonnes paires lors de l'assemblage. Est-ce que RUVBL1 et 2 ont un rôle dans cette sélection ? Le modèle d'action du R2TP est-il applicable à l'assemblage de la Liprine $\alpha 2$ par exemple, par le R2SP ? Les autres complexes existent-ils vraiment ? Pour le montrer, il faudrait changer de système cellulaire pour des cellules ciliées, ou changer les conditions de cultures pour créer un stress et peut-être ainsi stimuler la formation de ces complexes.

A court terme, *in vivo* il nous faut comprendre les mécanismes en jeu dans la perte des cellules souches et du compartiment d'amplification. A long terme, il serait intéressant de savoir si RPAP3 et PIH1D1 sont impliqués dans la ciliogénèse, en comparaison avec leurs protéines apparentées. Des données non publiées chez la drosophile montrent une stérilité chez les mâles suite à l'inactivation de *Spaghetti* (homologue de *RPAP3*). *SPAG1* a été mis en évidence dans la spermatogénèse. Le développement d'un modèle d'inactivation de *RPAP3* dans la spermatogénèse pourrait nous apporter des informations sur les fonctions du R2TP, et sur la possibilité des protéines à domaines RPAP3-Cter de se compenser l'une l'autre. Pour ce faire, il faudrait combiner l'allèle *RPAP3* floxé à une Cre exprimée dans les testicules, au cours de la spermatogénèse. Est-ce que nous avons des complexes qui sont spécifiques de certains tissus ou est-ce que ces protéines peuvent s'assembler différemment pour former des complexes « hybrides » ? Dans un premier temps, nous pourrions observer la fécondité des mâles invalidés pour *RPAP3* au cours de la spermatogénèse. Dans le cas avéré d'une stérilité, la première étape serait de comprendre d'où elle vient, est l'assemblage des dynéines qui est affecté comme dans le cas des mutants *SPAG1* et *PIH1D3*. Il faudrait dans un premier temps vérifier l'interaction entre *RPAP3* et les dyénines mais aussi avec la protéine *PIH1D3* par exemple. Est-ce qu'un défaut d'un complexe *RPAP3*-*PIH1D3*-*RUVBL1/2* pourrait être impliqué dans ce phénotype de stérilité ? Nous n'avons pas montré d'interaction entre *PIH1D3* et les *RUVBL* mais peut-être est-ce parce qu'elles sont recrutées par le domaine C-ter de *RPAP3*. Cela nous permettrait de montrer une fonction de *RPAP3* et du R2TP dans l'assemblage des dynéines et pourquoi pas, l'existence de complexes apparentés au R2TP.

B. Rôle du R2TP dans d'autres tissus

S'il s'avère que la voie Wnt est impliquée dans le phénotype observé, l'étude de *RPAP3* dans un tissu au renouvellement moins rapide mais où cette voie est aussi importante comme

pour le foie, pourrait nous renseigner sur la spécificité tissulaire de cette protéine. Le foie est un organe qui a une grande capacité de régénération en cas de dommages. En temps normal, la durée de vie des cellules hépatiques est de 200 à 300 jours contre une semaine environ pour les cellules intestinales. De plus, les métastases du cancer colorectal sont principalement au niveau du foie. Nous pouvons utiliser l'allèle *RPAP3* floxé avec une Cre spécifique du foie. Est-ce que les cellules souches du foie sont affectées et quand quel délai? Si l'on procède à une hépatectomie partielle, est ce que le foie est capable de se régénérer en absence de *RPAP3* ?

Le R2TP, de par sa fonction, est ubiquitaire. Il est cependant possible qu'il ait des substrats différents suivant l'organe ciblé. L'étude de l'invalidation de *RPAP3* dans différents types d'organes, exposé à des stress différents pourrait nous aider à découvrir de nouveaux substrats et fonction du R2TP.

V. Bibliographie

- Afanasyeva, A., Hirtreiter, A., Schreiber, A., Grohmann, D., Pobegalov, G., McKay, A.R., Tsaneva, I., Petukhov, M., Käs, E., Grigoriev, M., et al. (2014). Lytic water dynamics reveal evolutionarily conserved mechanisms of ATP hydrolysis by TIP49 AAA+ ATPases. *Structure* 22, 549-559.
- Ali, M.M.U., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., et Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440, 1013-1017.
- Angel Rivera-Calzada, Mohinder Pal, Degliesposti, G., Skehel, J.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Hugo Munoz-Hernandez, and O.L., Juan R. Luque-Ortega, David Gil-Carton, Rivera-Calzada, A., et al. (2017a). The Structure of the R2TP Complex Defines a Platform for Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular Chaperone System. *Structure* 25, 1145-1152.e4.
- Anido, J., Sáez-Borderías, A., González-Juncà, A., Rodón, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sánchez, R.M., Barba, I., Martínez-Sáez, E., Prudkin, L., et al. (2010). TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44^{high}/Id1^{high} Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18, 655-668.
- Back, R., Dominguez, C., Rothé, B., Bobo, C., Beaufils, C., Moréra, S., Meyer, P., Charpentier, B., Branlant, C., Allain, F.H.T.F.H.T.F.H.-T.T., et al. (2013). High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to the R2TP complex. *Structure* 21, 1834-1847.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., et al. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 280, 26729-26734.
- Bardin, A.J., Perdigoto, C.N., Southall, T.D., Brand, A.H., et Schweisguth, F. (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development* 137, 705-714.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. cell Biol. Rev.* 2008 Publ. 15, 19-33.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-1007.
- Batts, L.E., Polk, D.B., Dubois, R.N., et Kulesa, H. (2006). Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. *Dev. Dyn.* 235, 1563-1570.
- Bauer, A., Huber, O., et Kemler, R. (1998). Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14787-14792.
- Bauer, A., Chauvet, S., Huber, O., Usseglio, F., Rothbacher, U., Aragnol, D., Kemler, R., et Pradel, J. (2000). Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J.* 19, 6121-6130.
- Benbahouche, N.E.H., Iliopoulos, I., Török, I., Marhold, J., Henri, J., Kajava, A. V., Farkaš, R., Kempf, T., Schnölzer, M., Meyer, P., et al. (2014). *Drosophila* spag is the homolog of RNA polymerase II-associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *J. Biol. Chem.* 289, 6236-6247.
- Beraldo, F.H., Soares, I.N., Goncalves, D.F., Fan, J., Thomas, A.A., Santos, T.G., Mohammad, A.H., Roffe, M., Calder, M.D., Nikolova, S., et al. (2013). Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB J.* 27, 3594-3607.
- Berasain, C. (2010). New therapeutic targets in HCC: Reptin ATPase and HCC senescence. *J. Hepatol.* 52, 633-634.
- Bizarro, J., Charron, C., Boulon, S.S.S.S., Westman, B., Pradet-Balade, B.B.B.B., Vandermoere, F., Chagot, M.E., Hallais, M., Ahmad, Y., Leonhardt, H., et al. (2014). Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J. Cell Biol.* 207, 463-480.
- Bizarro, J., Dodré, M., Huttin, A., Charpentier, B., Schlotter, F., Branlant, C., Verheggen, C.,

Massenet, S., et Bertrand, E. (2015). NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res.* *43*, 8973-8989.

Boczek, E.E., Reefschläger, L.G., Dehling, M., Struller, T.J., Häusler, E., Seidl, A., Kaila, V.R.I., et Buchner, J. (2015). Conformational processing of oncogenic v-Src kinase by the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Bose, S., Weikl, T., Bügl, H., et Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* *274*, 1715-1717.

Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jády, B.E., Rothé, B., Pescia, C., Robert, M.-C.C., Kiss, T., et al. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* *180*, 579-595.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.-C.C., Ahmad, Y., Neel, H., et al. (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell* *39*, 912-924.

Boulon, S., Bertrand, E., et Pradet-Balade, B. (2012). HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: Building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biol.* *9*, 148-155.

van den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Hardwick, J.C.H., Schepman, B.L., Offerhaus, G.J., Keller, J.J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S.J.H., Roberts, D.J., et al. (2004). Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat. Genet.* *36*, 277-282.

Brinker, A., Scheufler, C., von der Mülbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., et Hartl, F.U. (2002). Ligand Discrimination by TPR Domains. *J. Biol. Chem.* *277*, 19265-19275.

Buczacki, S.J.A., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., et Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*.

Catalano, V., Turdo, A., Franco, S. Di, Dieli, F., Todaro, M., et Stassi, G. (2013). Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Semin. Cancer Biol.* *23*, 522-532.

Chan, A.T., et Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* *138*, 2029-2043.e10.

Chen, S., et Smith, D.F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* *273*, 35194-35200.

Cheng, H., et Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of 4 main epithelial cell types in mouse small intestine. 5 Unitarian theory of origin of 4 epithelial cell types. *Am. J. Anat.* *141*, 537-561.

Cheung, K.L.Y., Huen, J., Kakihara, Y., Houry, W.A., et Ortega, J. (2010). Alternative Oligomeric States of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex Induced by Histidine Tags. *J. Mol. Biol.* *404*, 478-492.

Cloutier, P., et Coulombe, B. (2010). New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Disabil Rehabil.* *88*, 211-221.

Cloutier, P., Poitras, C., Durand, M., Hekmat, O., Fiola-Masson, É., Bouchard, A., Faubert, D., Chabot, B., et Coulombe, B. (2017). R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat. Commun.* *8*, 15615.

Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., et Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab. Invest.* *84*, 1619-1630.

Crosnier, C., Stamataki, D., et Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 349-359.

Cunningham, C.N., Krukenberg, K.A., et Agard, D.A. (2008). Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *J. Biol. Chem.* *283*, 21170-21178.

- Czeko, E., Seizl, M., Augsberger, C., Mielke, T., et Cramer, P. (2011). Iwr1 Directs RNA Polymerase II Nuclear Import. *Mol. Cell* *42*, 261-266.
- Dahm, C.C., Keogh, R.H., Spencer, E.A., Greenwood, D.C., Key, T.J., Fentiman, I.S., Shipley, M.J., Brunner, E.J., Cade, J.E., Burley, V.J., et al. (2010). Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case-control study using food diaries. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 614-626.
- Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R.H., et Meier, U.T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J. Cell Biol.* *173*, 207-218.
- Dienstmann, R., Vermeulen, L., Guinney, J., Kopetz, S., Tejpar, S., et Tabernero, J. (2017). Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 79-92.
- Dong, F., Shinohara, K., Botilde, Y., Nabeshima, R., Asai, Y., Fukumoto, A., Hasegawa, T., Matsuo, M., Takeda, H., Shiratori, H., et al. (2014). Pih1d3 is required for cytoplasmic preassembly of axonemal dynein in mouse sperm. *J. Cell Biol.* *204*, 203-213.
- Dugan, K.A., Wood, M.A., et Cole, M.D. (2002). TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene* *21*, 5835-5843.
- Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N.F., et Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8965-8970.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* *435*, 959-963.
- van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012a). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1099-1104.
- van Es, J.H., Haegerbarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K.B.-K., Boj, S.F., Korving, J., Van Den Born, M., Van Oudenaarden, A., Robine, S., et al. (2012b). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol. Cell Biol.* *32*, 1918-1927.
- Fazio, V., Robertis, M., Massi, E., Poeta, M., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., et Signori, E. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J. Carcinog.* *10*, 9.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., et Huelsken, J. (2007). Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. Cell Biol.* *27*, 7551-7559.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* *527*, 472-476.
- van der Flier, L.G., et Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 241-260.
- van der Flier, L.G., Haegerbarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., et Clevers, H. (2009a). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* *137*, 15-17.
- van der Flier, L.G., van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegerbarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., et al. (2009b). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell*.
- Forafonov, F., Toogun, O. a, Grad, I., Suslova, E., Freeman, B.C., et Picard, D. (2008). p23/Sba1p protects against Hsp90 inhibitors independently of its intrinsic chaperone activity. *Mol. Cell Biol.* *28*, 3446-3456.
- Forget, D., Lacombe, A.-A., Cloutier, P., Lavallée-Adam, M., Blanchette, M., et Coulombe, B. (2013). Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6881-6891.
- Freeman, B.C., Toft, D.O., et Morimoto, R.I. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* *274*, 1718-1720.
- Frey, S., Leskovar, A., Reinstein, J., et Buchner, J. (2007). The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. *J. Biol. Chem.* *282*, 35612-35620.

- Gangaraju, V.K., Yin, H., Weiner, M.M., Wang, J., Huang, X.A., et Lin, H. (2011). *Drosophila* Piwi functions in Hsp90-mediated suppression of phenotypic variation. *Nat. Genet.* *43*, 153-158.
- Garabedian, E.M., Roberts, L.J.J., Mcnevin, M.S., et Gordon, J.I. (1997). Examining the Role of Paneth Cells in the Small Intestine by Lineage Ablation in Transgenic Mice * enoma formation in mice containing a mutation in the. *Biochemistry* *272*, 23729-23740.
- Gerbe, F., Legraverend, C., et Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 2907-2917.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* *529*.
- Gonzales, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S., et Oliveira, C.C. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a Novel Nop58p-interacting protein that is involved in Pre-rRNA processing. *J. Mol. Biol.* *346*, 437-455.
- Grad, I., McKee, T. a, Ludwig, S.M., Hoyle, G.W., Ruiz, P., Wurst, W., Floss, T., Miller, C. a, et Picard, D. (2006). The Hsp90 cochaperone p23 is essential for perinatal survival. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 8976-8983.
- Grad, I., Cederroth, C.R., Walicki, J., Grey, C., Barluenga, S., Winssinger, N., de Massy, B., Nef, S., et Picard, D. (2010). The molecular chaperone hsp90a is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. *PLoS One* *5*, e15770.
- Grammatikakis, N., Lin, J.H., Grammatikakis, A., Tschlis, P.N., et Cochran, B.H. (1999). p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1661-1672.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., et Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology* *129*, 626-638.
- Gribun, A., Cheung, K.L.Y., Huen, J., Ortega, J., et Houry, W.A. (2008). Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. *J. Mol. Biol.* *376*, 1320-1333.
- Grigoletto, A., Neaud, V., Allain-Courtois, N., Lestienne, P., et Rosenbaum, J. (2013). The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer Res.* *11*, 133-139.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., et Karin, M. (2010). *Immunity, Inflammation, and Cancer.* *Cell* *140*, 883-899.
- Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Österreicher, C.H., Hung, K.E., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*.
- Grozdanov, P.N., Roy, S., Kittur, N., et Meier, U.T. (2009). SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA* *15*, 1188-1197.
- Gulhati, P., Cai, Q., Li, J., Liu, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Lee, E.Y., Silva, S.R., Bowen, K.A., Gao, T., et al. (2009). Targeted Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Inhibits Tumorigenesis of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 7207-7216.
- Guo, Z., et Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates *Drosophila* intestinal stem cell multipotency. *Science* (80-.). *350*, aab0988-aab0988.
- Harris, S.F., Shiau, A.K., et Agard, D.A. (2004). The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure*.
- Haurie, V., Ménard, L., Nicou, A., Touriol, C., Metzler, P., Fernandez, J., Taras, D., Lestienne, P., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., et al. (2009). Adenosine triphosphatase Pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with Reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology* *50*, 1871-1883.
- Hayward, P., Kalmar, T., et Martinez Arias, A. (2008). Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* *135*, 411-424.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through

suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117-1121.

Hoareau-Aveilla, C., Bonoli, M., Caizergues-Ferrer, M., et Henry, Y. (2006). hNaf1 is required for accumulation of human box H/ACA snoRNPs, scaRNPs, and telomerase. *RNA* 12, 832-840.

Holik, A.Z., Krzystyniak, J., Young, M., Richardson, K., Jardé, T., Chambon, P., Shorning, B.Y., et Clarke, A.R. (2013). Brg1 is Required for Stem Cell Maintenance in the Murine Intestinal Epithelium in a Tissue-Specific Manner. *Stem Cells* 31, 2457-2466.

Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., et al. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.*

Hořejší, Z., Takai, H., Adelman, C.A., Collis, S.J., Flynn, H., Maslen, S., Skehel, J.M., de Lange, T., et Boulton, S.J. (2010a). CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell* 39, 839-850.

Hořejší, Z., Takai, H., Adelman, C.A., Collis, S.J., Flynn, H., Maslen, S., Skehel, J.M., de Lange, T., Boulton, S.J., Horejsí, Z., et al. (2010b). CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell* 39, 839-850.

Hořejší, Z., Stach, L., Flower, T.G., Joshi, D., Flynn, H., Skehel, J.M., O'Reilly, N.J., Ogrodowicz, R.W., Smerdon, S.J., et Boulton, S.J. (2014). Phosphorylation-Dependent PIH1D1 Interactions Define Substrate Specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell Rep.* 7, 19-26.

Huber, O., Ménard, L., Haurie, V., Nicou, A., Taras, D., et Rosenbaum, J. (2008). Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res.* 68, 6873-6876.

Huen, J., Kakihara, Y., Ugwu, F., Cheung, K.L.Y., Ortega, J., et Houry, W.A. (2010). Rvb1-Rvb2: essential ATP-dependent helicases for critical complexes This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled 8th International Conference on AAA Proteins and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* 88, 29-40.

Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., et Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-473.

Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyangi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y., et Udono, H. (2011). Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16363-16368.

Iwasa, T., Han, Y.-W., Hiramatsu, R., Yokota, H., Nakao, K., Yokokawa, R., Ono, T., et Harada, Y. (2016). Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation. *Sci. Rep.* 5, 18177.

Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., Hirano, H., Anderson, P., et Ohno, S. (2010). AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci. Signal.* 3, ra27.

Jády, B.E., Bertrand, E., et Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J. Cell Biol.* 164, 647-652.

Jarosz, D.F., et Lindquist, S. (2010). Hsp90 and Environmental Stress Transform the Adaptive Value of Natural Genetic Variation. *Science* (80-).

Jha, S., et Dutta, A. (2009). RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol. Cell* 34, 521-533.

Jha, S., Gupta, A., Dar, A., et Dutta, A. (2013). RVBs are required for assembling a functional TIP60 complex. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1164-1174.

Jhaveri, K., Taldone, T., Modi, S., et Chiosis, G. (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 742-755.

Jiménez, B., Ugwu, F., Zhao, R., Ortí, L., Makhnevych, T., Pineda-Lucena, A., et Houry, W.A. (2012). Structure of Minimal Tetratricopeptide Repeat Domain Protein Tah1 Reveals Mechanism of Its Interaction with Pih1 and Hsp90. *J. Biol. Chem.* 287, 5698-5709.

Johnson, J.L., et Toft, D.O. (1994). A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J. Biol. Chem.* 269, 24989-24993.

- Jones, S., Chen, W. -d., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4283-4288.
- Jónsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A., et Dutta, A. (2004). Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell* *16*, 465-477.
- Junttila, M.R., et de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* *501*, 346-354.
- Kakihara, Y., et Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: Discovery and functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1823*, 101-107.
- Kakihara, Y., et Saeki, M. (2014). The R2TP chaperone complex: Its involvement in snoRNP assembly and tumorigenesis. *Biomol. Concepts* *5*, 513-520.
- Kalluri, R., et Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 392-401.
- Karagöz, G.E., Duarte, A.M.S., Akoury, E., Ippel, H., Biernat, J., Morán Luengo, T., Radli, M., Didenko, T., Nordhues, B.A., Veprintsev, D.B., et al. (2014). Hsp90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action. *Cell* *156*, 963-974.
- Karam, J.A., Parikh, R.Y., Nayak, D., Rosenkranz, D., et Gangaraju, V.K. (2017). Co-chaperone Hsp70/Hsp90-organizing protein (Hop) is required for transposon silencing and Piwi-interacting RNA (piRNA) biogenesis. *J. Biol. Chem.* *292*, 6039-6046.
- King, T.H., Decatur, W.A., Bertrand, E., Maxwell, E.S., et Fournier, M.J. (2001). A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7731-7746.
- Kinzler, K., Nilbert, M., Su, L., Vogelstein, B., Bryan, T., Levy, D., Smith, K., Preisinger, A., Hedge, P., McKechnie, D., et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* (80-.). *253*, 661-665.
- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P.R., et Agard, D.A. (2014). Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* *157*, 1685-1697.
- Knowles, M.R., Ostrowski, L.E., Loges, N.T., Hurd, T., Leigh, M.W., Huang, L., Wolf, W.E., Carson, J.L., Hazucha, M.J., Yin, W., et al. (2013). Mutations in SPAG1 cause primary ciliary dyskinesia associated with defective outer and inner dynein arms. *Am. J. Hum. Genet.* *93*, 711-720.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., et Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* *19*, 379-383.
- Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15418-15423.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., et Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* *18*, 601-607.
- Krausova, M., et Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell. Signal.* *26*, 570-579.
- Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., et Kuo, C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 266-271.
- Lachowiec, J., Lemus, T., Borenstein, E., et Queitsch, C. (2015). Hsp90 promotes kinase evolution. *Mol. Biol. Evol.* *32*, 91-99.
- Lakomek, K., Stoehr, G., Tosi, A., Schmailzl, M., et Hopfner, K.P. (2015). Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ at pases rvb1·Rvb2. *Structure* *23*, 483-495.
- Lasry, A., Zinger, A., et Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat. Immunol.*
- de Lau, W., Kujala, P., Schneeberger, K., Middendorp, S., Li, V.S.W., Barker, N., Martens, A.,

- Hofhuis, F., DeKoter, R.P., Peters, P.J., et al. (2012). Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5+ Stem Cells Require SpiB and Are Induced by RankL in Cultured « Miniguts ». *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3639-3647.
- Leedham, S.J., Brittan, M., McDonald, S.A.C., et Wright, N.A. (2005). Intestinal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 11-24.
- Leskovar, A., Wegele, H., Werbeck, N.D., Buchner, J., et Reinstein, J. (2008). The ATPase cycle of the mitochondrial Hsp90 analog trap1. *J. Biol. Chem.*
- Leulliot, N., Godin, K.S., Hoareau-Aveilla, C., Quevillon-Cheruel, S., Varani, G., Henry, Y., et Van Tilbeurgh, H. (2007). The Box H/ACA RNP Assembly Factor Naf1p Contains a Domain Homologous to Gar1p Mediating its Interaction with Cbf5p. *J. Mol. Biol.* **371**, 1338-1353.
- Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1062-1073.
- Li, L., et Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science* (80-.). **327**, 542-545.
- Li, J., Soroka, J., et Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 624-635.
- Li, S., Duan, J., Li, D., Yang, B., Dong, M., et Ye, K. (2011). Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. *Genes Dev.*
- Li, W., Zeng, J., Li, Q., Zhao, L., Liu, T., Björkholm, M., Jia, J., et Xu, D. (2010). Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Mol. Cancer* **9**, 132.
- Lisanti, S., Tavecchio, M., Chae, Y.C., Liu, Q., Brice, A.K., Thakur, M.L., Languino, L.R., et Altieri, D.C. (2014). Deletion of the mitochondrial chaperone TRAP-1 uncovers global reprogramming of metabolic networks. *Cell Rep.* **8**, 671-677.
- Logan, C.Y., et Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- Lovgren, A.K., Kovarova, M., et Koller, B.H. (2007). cPGES/p23 is required for glucocorticoid receptor function and embryonic growth but not prostaglandin E2 synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4416-4430.
- Lustig, A.J., et Petes, T.D. (1986). Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 1398-1402.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., et Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* **6**, 666-677.
- Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N., et Meier, U.T. (2012). Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *Rna* **18**, 1833-1845.
- Madison, B.B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X.T., et Gumucio, D.L. (2004). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**.
- Malinová, A., Cvačková, Z., Matějů, D., Hořejší, Z., Abéza, C., Vandermoere, F., Bertrand, E., Staněk, D., et Verheggen, C. (2017). Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* **216**, jcb.201701165.
- El Marjou, F., Janssen, K.-P.P., Hung-Junn Chang, B., Li, M., rie Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., Robine, S., et al. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* **39**, 186-193.
- Massenet, S., Bertrand, E., et Verheggen, C. (2017). Review Assembly and trafficking of box C / D and H / ACA snoRNPs. *RNA Biol.* **14**, 00-00.
- Matias, P.M., Gorynia, S., Donner, P., et Carrondo, M.A. (2006). Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* **281**, 38918-38929.
- McClure-Begley, T.D., et Klymkowsky, M.W. (2017). Nuclear roles for cilia-associated proteins. *Cilia.*
- McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Boulon, S., Bertrand, E., et Watkins, N.J. (2007). A dynamic

scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6782-6793.

McKeegan, K.S., Debieux, C.M., et Watkins, N.J. (2009). Evidence that the AAA+ Proteins TIP48 and TIP49 Bridge Interactions between 15.5K and the Related NOP56 and NOP58 Proteins during Box C/D snoRNP Biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4971-4981.

McLaughlin, S.H., Sobott, F., Yao, Z.P., Zhang, W., Nielsen, P.R., Grossmann, J.G., Laue, E.D., Robinson, C. V., et Jackson, S.E. (2006). The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J. Mol. Biol.*

Mellott, D.O., Thisdelle, J., et Burke, R.D. (2017). Notch signaling patterns neurogenic ectoderm and regulates the asymmetric division of neural progenitors in sea urchin embryos. *Development* 144, dev.151720.

Meyer, P. (2004). Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.*

Middelhoff, M., Westphalen, C.B., Hayakawa, Y., Yan, K.S., Gershon, M.D., Wang, T.C., et Quante, M. (2017). Dcl1-expressing tuft cells: Critical modulators of the intestinal niche? *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* ajpgi.00073.2017.

Mollapour, M., Tsutsumi, S., Donnelly, A.C., Beebe, K., Tokita, M.J., Lee, M.-J., Lee, S., Morra, G., Bourboulia, D., Scroggins, B.T., et al. (2010). Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. *Mol. Cell* 37, 333-343.

Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E.G., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Moore, W.E., et Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202-3207.

Morgan, R.M.L., Pal, M., Roe, S.M., Pearl, L.H., et Prodromou, C. (2015). Tah1 helix-swap dimerization prevents mixed Hsp90 co-chaperone complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*

von Morgen, P., Burdova, K., Flower, T.G., O'Reilly, N.J., Boulton, S.J., Smerdon, S.J., Macurek, L., et Hořejší, Z. (2017). MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex. *Oncogene* 36, 4943-4950.

Moser, A.R., Pitot, H.C., et Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322-324.

Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., McNeley, M.K., Shoemaker, A.R., et Dove, W.F. (1995). ApcMin: A mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur. J. Cancer* 31, 1061-1064.

Moser, C., Lang, S.A., et Stoeltzing, O. (2009a). Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res.* 29, 2031-2042.

Moser, C., Lang, S. a, et Stoeltzing, O. (2009b). Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res.* 29, 2031-2042.

Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J.* 31, 3079-3091.

Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J.A., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., Newsham, I.F., et al. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337.

Neckers, L., et Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18, 64-76.

Neckers, L., Tsutsumi, S., et Mollapour, M. (2009). Visualizing the twists and turns of a molecular chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 235-236.

Newman, D.R., Kuhn, J.F., Shanab, G.M., et Maxwell, E.S. (2000). Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *Rna* 6, 861-879.

Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Stengel, F., Wei, D., Aebersold, R., Wu, C., et Leschziner, A.E.

(2013). Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1. *Cell* 154, 1220-1231.

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., et Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665-669.

Oberoi, J., Dunn, D.M., Woodford, M.R., Mariotti, L., Schulman, J., Bourboulia, D., Mollapour, M., et Vaughan, C.K. (2016). Structural and functional basis of protein phosphatase 5 substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9009-9014.

Olcese, C., Patel, M.P., Shoemark, A., Kiviluoto, S., Legendre, M., Williams, H.J., Vaughan, C.K., Hayward, J., Goldenberg, A., Emes, R.D., et al. (2017). X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat. Commun.* 8, 14279.

Omer, A.D., Ziesche, S., Ebhardt, H., et Dennis, P.P. (2002). In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5289-5294.

Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N.T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., et al. (2008). Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611-616.

Ou, W.B., Luo, W., Park, Y.D., et Zhou, H.M. (2001). Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding. *Protein Sci.* 10, 2346-2353.

Paci, A., Liu, X.H., Huang, H., Lim, A., Houry, W.A., et Zhao, R. (2012). The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *J. Biol. Chem.*

Pai, S.G., Carneiro, B.A., Mota, J.M., Costa, R., Leite, C.A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J.B., Chae, Y.K., et Giles, F.J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J. Hematol. Oncol.* 10, 101.

Pal, M., Morgan, M., Phelps, S.E.L., Roe, S.M., Parry-Morris, S., Downs, J.A., Polier, S., Pearl, L.H., et Prodromou, C. (2014). Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure* 22, 805-818.

Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J.K., Singh, S., Millson, S.H., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., et al. (2002). Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1. *Mol. Cell* 10, 1307-1318.

Panizzi, J.R., Becker-Heck, A., Castleman, V.H., Al-Mutairi, D.A., Liu, Y., Loges, N.T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., et al. (2012). CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat. Genet.* 44, 714-719.

Pavlidis, S., Tsirigos, A., Vera, I., Flomenberg, N., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Pestell, R.G., Outschoorn, U.E.M., Howell, A., et al. (2010). Transcriptional evidence for the "Reverse Warburg Effect" in human breast cancer tumor stroma and metastasis: Similarities with oxidative stress, inflammation, Alzheimer's disease, and "Neuron-Glia Metabolic Coupling" www.impactaging.com AGING 2.

Peng, W.T., Robinson, M.D., Mnaimneh, S., Krogan, N.J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A.P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, W., et al. (2003). A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. *Cell* 113, 919-933.

Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., et Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348, 166-168.

Pick, E., Kluger, Y., Giltnane, J.M., Moeder, C., Camp, R.L., Rimm, D.L., et Kluger, H.M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* 67, 2932-2937.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., et Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709-1713.

Plaks, V., Kong, N., et Werb, Z. (2015a). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell* 16, 225-238.

Plaks, V., Kong, N., et Werb, Z. (2015b). The cancer stem cell niche: how essential is the

niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* 16, 225-238.

Potten, C.S., et Hendry, J.H. (1975). Differential regeneration of intestinal proliferative cells and cryptogenic cells after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Mary, K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Shawn, E., et al. (2013). The pan-ErbB negative regulator, Lrig1, is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *NIH Public Access* 149, 146-158.

Pratt, W.B., et Dittmar, K.D. (1998). Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *Trends Endocrinol. Metab.*

Pratt, W.B., et Toft, D.O. (1997). Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.3.0303>.

Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem. J.* 473, 2439-2452.

Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., et Pearl, L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90, 65-75.

Puri, T., Wendler, P., Sigala, B., Saibil, H., et Tsaneva, I.R. (2007). Dodecameric Structure and ATPase Activity of the Human TIP48/TIP49 Complex. *J. Mol. Biol.* 366, 179-192.

Qiu, X.B., Lin, Y.L., Thome, K.C., Pian, P., Schlegel, B.P., Weremowicz, S., Parvin, J.D., et Dutta, A. (1998). An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J. Biol. Chem.* 273, 27786-27793.

Queitsch, C., Sangster, T.A., et Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618-624.

Quintern, M., Roth, B., Barbier, M., Bobo, C., Saliou, J.M., Jacquemin, C., Back, R., Chagot, M.E., Cianfrani, S., Meyer, P., et al. (2015). Structure/Function Analysis of Protein-Protein Interactions Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP Assembly. *J. Mol. Biol.* 427, 2816-2839.

Raidt, J., Wallmeier, J., Hjej, R., Onnebrink, J.G., Pennekamp, P., Loges, N.T., Olbrich, H., Hoffner, K., Dougherty, G.W., Omran, H., et al. (2014). Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* 44, 1579-1588.

Raymond, A.-A., Benhamouche, S., Neaud, V., Di Martino, J., Javary, J., et Rosenbaum, J. (2015). Reptin regulates DNA double strand breaks repair in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 10, e0123333.

Reichow, S.L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A.R., et Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 1452-1464.

Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., et Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep.* 9, 377-383.

Richter, K., Walter, S., et Buchner, J. (2004). The co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *J. Mol. Biol.* 342, 1403-1413.

van Rijn, J.M., Schneeberger, K., Wiegerinck, C.L., Nieuwenhuis, E.E.S., et Middendorp, S. (2016). Novel approaches: Tissue engineering and stem cells – In vitro modelling of the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 281-293.

Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1, 97-98.

Rizk, P., et Barker, N. (2012). Gut stem cells in tissue renewal and disease: Methods, markers, and myths. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*

Rocha, C., Papon, L., Cacheux, W., Marques Sousa, P., Lascano, V., Tort, O., Giordano, T., Vacher, S., Lemmers, B., Mariani, P., et al. (2014). Tubulin glycosylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J.* 33, 2247-2260.

Roe, S.M., Ali, M.M.U., Meyer, P., Vaughan, C.K., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., et Pearl, L.H. (2004). The Mechanism of Hsp90 Regulation by the Protein Kinase-Specific Cochaperone p50cdc37. *Cell.*

Röhl, A., Tippel, F., Bender, E., Schmid, A.B., Richter, K., Madl, T., et Buchner, J. (2015).

Hop/Sti1 phosphorylation inhibits its co-chaperone function. *EMBO Rep.* *16*, 240-249.

Rohner, N., Jarosz, D.F., Kowalko, J.E., Yoshizawa, M., Jeffery, W.R., Borowsky, R.L., Lindquist, S., et Tabin, C.J. (2013). Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science* *342*, 1372-1375.

Rossi, A.M., et Desplan, C. (2017). Asymmetric Notch Amplification to Secure Stem Cell Identity. *Dev. Cell* *40*, 513-514.

Rothé, B., Back, R., Quinternet, M., Bizarro, J., Robert, M.-C.C., Blaud, M., Romier, C., Manival, X., Charpentier, B., Bertrand, E., et al. (2014a). Characterization of the interaction between protein Snu13p/15.5K and the Rsa1p/NUFIP factor and demonstration of its functional importance for snoRNP assembly. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2015-2036.

Rothé, B., Saliou, J.M., Quinternet, M., Back, R., Tiotiu, D., Jacquemin, C., Loegler, C., Schlotter, F., Peña, V., Eckert, K., et al. (2014b). Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic Acids Res.* *42*, 10731-10747.

Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., et Chinkers, M. (1999). Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* *274*, 20060-20063.

Rutherford, S.L., et Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* *396*, 336-342.

Sangiorgi, E., et Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* *40*, 915-920.

Sato, T., Es, J.H. Van, Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., Born, V. Den, Barker, N., Shroyer, N.F., Wetering, M. Van De, Clevers, H., et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* *469*, 415-418.

Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H.J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., et al. (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* *145*, 926-940.

Schröder, N., et Gossler, A. (2002). Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr. Patterns* *2*, 247-250.

Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* *152*, 25-38.

Sepehrnia, B., Paz, I.B., Dasgupta, G., et Momand, J. (1996). Heat Shock Protein 90 Forms a Complex with Mutant p53 Protein Predominantly within a Cytoplasmic Compartment of the Cell*. *J. Biol. Chem.* *271*.

Sessa, W.C., García-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., et Papapetropoulos, A. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* *392*, 821-824.

Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M., et Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* *60*, 307-317.

Snider, J., Gutsche, I., Lin, M., Baby, S., Cox, B., Butland, G., Greenblatt, J., Emili, A., et Houry, W.A. (2006). Formation of a distinctive complex between the inducible bacterial lysine decarboxylase and a novel AAA+ ATPase. *J. Biol. Chem.* *281*, 1532-1546.

Specchia, V., Piacentini, L., Tritto, P., Fanti, L., D'Alessandro, R., Palumbo, G., Pimpinelli, S., et Bozzetti, M.P. (2010). Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature* *463*, 662-665.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., et Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* *256*, 668-670.

Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., et Tanaka, T. (2004). Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* *95*, 721-727.

Taipale, M., Jarosz, D.F., et Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis:

emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 515-528.

Taipale, M., Krykbaeva, I., Koeva, M., Kayatekin, C., Westover, K.D., Karras, G.I., et Lindquist, S. (2012). Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*.

Takai, H., Wang, R.C., Takai, K.K., Yang, H., et de Lange, T. (2007). Tel2 Regulates the Stability of PI3K-Related Protein Kinases. *Cell* *131*, 1248-1259.

Takai, H., Xie, Y., De Lange, T., et Pavletich, N.P. (2010). Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev.* *24*, 2019-2030.

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M.R., Wang, Q., Lu, M.M., et Epstein, J.A. (2011). Interconversion Between Intestinal Stem Cell Populations in Distinct Niches. *Science* (80-). *334*, 1420-1424.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., et Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*.

Tariq, M., Nussbaumer, U., Chen, Y., Beisel, C., et Paro, R. (2009). Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1157-1162.

Tarkar, A., Loges, N.T., Slagle, C.E., Francis, R., Dougherty, G.W., Tamayo, J. V, Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., et al. (2013). DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.* *45*, 995-1003.

Tauc, H.M., Tasdogan, A., Meyer, P., et Pandur, P. (2017). Nipped-A regulates intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Development* *144*, 612-623.

Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J.P., et Chouaib, S. (2017). New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* *11*, 824-846.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., De Sauvage, F.J., Hua Tian, 1, Biehs, B., et al. (2012). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* *76*, 255-259.

Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C.W., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., et Klein, O.D. (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep.* *11*, 33-42.

Tian, S., Yu, G., He, H., Zhao, Y., Liu, P., Marshall, A.G., Demeler, B., Stagg, S.M., et Li, H. (2017). Pih1p-Tah1p Puts a Lid on Hexameric AAA+ ATPases Rvb1/2p. *Structure* *25*, 1519-1529.e4.

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., et al. (2014a). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* *14*, 342-356.

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., et al. (2014b). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* *14*, 342-356.

Torrado, B., Graña, M., Badano, J.L., et Irigoín, F. (2016). Ciliary entry of the Hedgehog transcriptional activator Gli2 is mediated by the nuclear import machinery but differs from nuclear transport in being Imp- α/β 1-independent. *PLoS One*.

Torreira, E., Jha, S., López-Blanco, J.R., Arias-Palomo, E., Chacón, P., Cañas, C., Ayora, S., Dutta, A., et Llorca, O. (2008). Architecture of the Pontin/Reptin Complex, Essential in the Assembly of Several Macromolecular Complexes. *Structure* *16*, 1511-1520.

Tosi, A., Haas, C., Herzog, F., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Ungewickell, C., Gerhold, C.B., Lakomek, K., Aebersold, R., Beckmann, R., et al. (2013). XStructure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell* *154*, 1207-1219.

VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* *139*, 488-497.

Vartholomaiou, E., Madon-Simon, M., Hagmann, S., Mühlebach, G., Wurst, W., Floss, T., et Picard, D. (2017). Cytosolic Hsp90 α and its mitochondrial isoform Trap1 are differentially required in a breast cancer model. *Oncotarget* *8*, 17428-17442.

- Vaughan, C.K., Gohlke, U., Sobott, F., Good, V.M., Ali, M.M.U., Prodromou, C., Robinson, C. V., Saibil, H.R., et Pearl, L.H. (2006). Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 Complex. *Mol. Cell* 23, 697-707.
- Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., et Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly. *Cell* 132, 945-957.
- Verheggen, C., et Bertrand, E. (2012). CRM1 plays a nuclear role in transporting snoRNPs to nucleoli in higher eukaryotes. *Nucleus* 3, 132-137.
- Verheggen, C., Mouaikel, J., Thiry, M., Blanchard, J.M., Tollervy, D., Bordonné, R., Lafontaine, D.L.J., et Bertrand, E. (2001). Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J.* 20, 5480-5490.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L.J., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonné, R., et Bertrand, E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* 21, 2736-2745.
- Verheggen, C., Pradet-Balade, B., et Bertrand, E. (2015). SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway. *Oncotarget* 6, 1-2.
- Vermeulen, L., et Snippert, H.J. (2014). Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat. Rev. Cancer* 14, 468-480.
- Voss, A.K., Thomas, T., et Gruss, P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 127, 1-11.
- Wandinger, S.K., Richter, K., et Buchner, J. (2017). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473-18477.
- Wang, C., et Meier, T. (2004). Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *EMBO J.* 23.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A. V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., et al. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.
- Washington, M.K., Powell, A.E., Sullivan, R., Sundberg, J.P., Wright, N., Coffey, R.J., et Dove, W.F. (2013). Pathology of rodent models of intestinal cancer: Progress report and recommendations. *Gastroenterology* 144, 705-717.
- Watkins, N.J., Dickmanns, A., et Lührmann, R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8342-8352.
- Wei, J., Wu, A., Kong, L.-Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., et Heimberger, A.B. (2011). Hypoxia Potentiates Glioma-Mediated Immunosuppression. *PLoS One* 6.
- Whitesell, L., Santagata, S., Mendillo, M.L., Lin, N.U., Proia, D.A., et Lindquist, S. (2014). HSP90 empowers evolution of resistance to hormonal therapy in human breast cancer models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18297-18302.
- Wodarz, A., et Nusse, R. (1998). MECHANISMS OF WNT SIGNALING IN DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88.
- Wood, M. a, McMahon, S.B., et Cole, M.D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell* 5, 321-330.
- Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T.J., de Leon, G.P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., Wu, X., Ridgway, J., et al. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 464, 1052-1057.
- Yamamoto, R., Hirono, M., et Kamiya, R. (2010). Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins. *J. Cell Biol.* 190, 65-71.
- Yan, K., Chia, L., et Li, X. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Pnas* 109, 466-471.
- Yang, P.K., Hoareau, C., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y., et Chanfreau, G. (2005). Cotranscriptional Recruitment of the Pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA Binding Protein Naf1p during H/ACA snoRNP Assembly. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3295-3304.
- Yoshida, M., Saeki, M., Egusa, H., Irie, Y., Kamano, Y., Uraguchi, S., Sotozono, M., Niwa, H.,

et Kamisaki, Y. (2013a). RPAP3 splicing variant isoform 1 interacts with PIH1D1 to compose R2TP complex for cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Yoshida, S., Tsutsumi, S., Muhlebach, G., Sourbier, C., Lee, M.-J., Lee, S., Vartholomaiou, E., Tatokoro, M., Beebe, K., Miyajima, N., et al. (2013b). Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1604-12.

Zhang, M., Kadota, Y., Prodromou, C., Shirasu, K., et Pearl, L.H. (2010). Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol. Cell* *39*, 269-281.

Zhao, R., et Houry, W.A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.* *83*, 703-710.

Zhao, L.L., Yuan, S., Cao, Y., Kallakuri, S., Li, Y., Kishimoto, N., DiBella, L., et Sun, Z. (2013). Reptin/Ruvbl2 is a Lrrc6/Seahorse interactor essential for cilia motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 12697-12702.

Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., et al. (2005). Navigating the chaperone network: An integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* *120*, 715-727.

Zhao, R., Kakihara, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., et al. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.* *180*, 563-578.

Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., et Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* *527*, 525-530.

Zhong, W., Jiang, M.M., Weinmaster, G., et Jan, Y.N. (1997). Differential expression of mammalian Numb, Numlike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development* *124*, 1887-1897.

Zhou, C.Y., Stoddard, C.I., Johnston, J.B., Trnka, M.J., Echeverria, I., Palovcak, E., Sali, A., Burlingame, A.L., Cheng, Y., et Narlikar, G.J. (2017). Regulation of Rvb1/Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones. *Cell Rep.* *19*, 2033-2044.

Zhou, Y., Rychahou, P., Wang, Q., Weiss, H.L., et Evers, B.M. (2015). TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. *Cell Death Dis.* *6*, e1631.

Zizza, P., Cingolani, C., Artuso, S., Salvati, E., Rizzo, A., D'Angelo, C., Porru, M., Pagano, B., Amato, J., Randazzo, A., et al. (2016). Intragenic G-quadruplex structure formed in the human CD133 and its biological and translational relevance. *Nucleic Acids Res.* *44*, 1579-1590.