



HAL
open science

HELZ2, une nouvelle ribonucléase humaine impliquée dans le métabolisme des ARN ?

Jordan Sinteff

► **To cite this version:**

Jordan Sinteff. HELZ2, une nouvelle ribonucléase humaine impliquée dans le métabolisme des ARN ?. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ096 . tel-03270834

HAL Id: tel-03270834

<https://theses.hal.science/tel-03270834>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :

Jordan SINTEFF

soutenue le : 12 décembre 2019

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**HELZ2, une nouvelle ribonucléase
humaine impliquée dans le
métabolisme des ARN ?**

THÈSE dirigée par :

Dr. SERAPHIN Bertrand

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BEHM-ANSMANT Isabelle

Chargée de recherche, Université de Lorraine

Dr. PORRUA-FUERTE Odil

Chargée de recherche, Université Paris Diderot

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. ALLMANG-CURA Christine

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie le Dr BEHM-ANSMANT Isabelle et le Dr PORRUA-FUERTE Odil pour s'être intéressées à mon travail et pour avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie également le Dr ALLMANG-CURA Christine d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse afin d'examiner mes travaux.

Mes remerciements vont évidemment à mon directeur de thèse, le Dr Bertrand SERAPHIN, qui m'a permis d'effectuer mon stage de master puis ma thèse au sein de son laboratoire. Je vous remercie d'avoir su rester disponible lorsque j'avais besoin de votre aide, d'avoir été patient et toujours d'une grande rigueur.

Je souhaite également remercier la Ligue nationale contre le Cancer pour avoir financé mes quatre années de thèse. Merci également à tous les intervenants ayant assuré les cours proposés par le *PhD programme* et à Francine DENIER pour l'organisation de ces cours. Je tiens également à remercier Nicolas CHARLET et Anne-Marie DUCHÊNE pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et pour leurs remarques pertinentes et leurs conseils.

Je souhaite tout particulièrement remercier Eric HUNTZINGER qui m'a encadré pendant mon stage puis ma thèse. Grâce à toi j'ai beaucoup progressé d'un point de vue intellectuel et pratique. Tes remarques m'ont permis d'aiguiser mon sens critique et d'appréhender d'une manière plus rigoureuse et méthodique les problématiques rencontrées lors de mes recherches. J'ai particulièrement apprécié l'équilibre entre l'autonomie et l'accompagnement que tu m'as laissé durant mes quatre années de thèse.

Je tiens également à remercier les autres membres du laboratoire avec qui j'ai pu travailler durant ma thèse : Hamza AMINE, Claudine GAUDON-PLESSE, Olga KOLAJ-ROBIN, Mélanie MAHE, Séverine MANGOLD, Fabienne MAUXION, Mélody MATELOT, Monica PENA-LUNA, Pauline ROUILLARD, Vladimir RUDKO, Jérémy SCUTENAIRE, Benjamin STUPFLER, Valerio TAVERNITI et Flora TODESCO. Merci à vous tous pour avoir toujours été disponibles, pour votre aide et votre soutien indéfectible autant scientifique que moral, ainsi que pour tous les moments passés ensemble. Cette thèse n'aurait pas été aussi agréable et enrichissante sans vous.

J'aimerais également remercier les personnes que j'ai pu rencontrer et avec lesquelles j'ai pu discuter/débattre/apprendre/jouer durant ma thèse : Denis FUMAGALLI, Angeline GAUCHEROT, Régis LUTZING, Pierre « PJ » MARSCHALL, Michel NEY et Simone PELLEGRINO. Merci pour votre gentillesse, votre soutien et pour tous les bons moments.

J'aimerais également remercier les membres des différentes plateformes dont j'ai pu bénéficier des services. Merci à Betty HELLER et à tout le service de culture cellulaire pour vos conseils, la rapidité et la qualité de votre travail. Merci à Claudine EBEL et Muriel PHILIPPS pour m'avoir conseillé et guidé lors des expériences de tri cellulaire. Merci à tous les membres du centre d'imagerie pour m'avoir appris à utiliser les différents microscopes dont j'avais besoin. Merci à tous les membres du service informatique pour leur rapidité et leur efficacité. Encore merci à Denis FUMAGALLI, d'avoir préparé les solutions du service Mediaprep. Merci à Paola ROSSOLILLO service de biologie moléculaire pour m'avoir conseillé sur les clonages et m'avoir fourni les plasmides dont j'avais besoin. Merci au service de Baculovirus d'avoir démarré le projet de production protéique en cellules d'insectes. Merci à Evelina EDELWEISS de m'avoir initié à la culture des cellules d'insectes ainsi qu'à l'infection par Baculovirus. Merci à Jean-Marie GARNIER, pour les conseils de PCR et de clonage.

Je tiens à remercier tous mes amis en dehors de l'institut, et plus particulièrement : Célia, Alexis, Carine, Jessica, Fabien, Frank, Camille, Floriane, Aude, Justin et Clément. Merci infiniment pour votre soutien et d'avoir été là pour me permettre de me changer les idées.

Un énorme merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents, à Loïc, à Chloé et à Elisabeth pour leur soutien sans faille et pour m'avoir encouragé à chaque fois que j'ai douté de moi et merci d'avoir toujours cru en moi.

Enfin, merci à Manon, qui partage ma vie depuis plus de six ans déjà. Merci d'être comme tu es, joyeuse et optimiste. Ne change jamais.

Résumé

Titre :

HELZ2, une nouvelle ribonucléase humaine impliquée dans le métabolisme des ARN ?

Les acides ribonucléiques (ARN) sont de deux types : les ARN messagers (ARNm) qui sont des ARN codants, et les ARN non codants. Les ARN sont synthétisés dans le noyau à partir de l'ADN. Les ARNm subissent de nombreuses maturations telles l'ajout d'une coiffe à leur extrémité 5' et/ou queue polyA en leur extrémité 3'. Si la plupart des réactions de maturations se font dans le noyau, quelques-unes peuvent aussi intervenir dans le cytoplasme. Les ARNm sont ensuite traduits en protéine par le ribosome. La machinerie responsable de la dégradation des ARN qui ne sont plus nécessaires ou qui sont endommagés est étudiée depuis de nombreuses années. Toutes les étapes dans la vie des ARN contribuent au contrôle de l'expression des gènes chez tous les organismes vivants. De plus, elles permettent la mise en place de programmes d'expression de gènes spécifiques.

Chez l'homme, des dysfonctionnements dans ces voies de régulation de l'expression des gènes sont associés à des maladies génétiques et des cancers. Les ribonucléases ont une importance particulière dans ces voies de régulation puisqu'elles portent l'activité catalytique nécessaire à la maturation/dégradation des ARN cibles. La caractérisation de l'ensemble des ribonucléases exprimées, de leurs partenaires et de leurs cibles est donc cruciale pour comprendre comment les cellules adaptent leurs programmes d'expression génétique en fonction de signaux extracellulaires.

Les ribonucléases de la famille RNaseII/RNB sont conservées des bactéries à l'Homme et sont impliquées dans la maturation et la dégradation des ARN. Chez l'homme, trois membres de cette famille sont connus actuellement : DIS3, DIS3L1 et DIS3L2. Au niveau pathologique, des mutations localisées au niveau du domaine RNB de DIS3 ou DIS3L2 sont associées au développement de cancer de type colorectal, de mélanomes, de leucémie myéloïde chronique ou au développement de tumeurs de Wilms selon la protéine mutée.

Par recherche dans les bases de données et par alignement de séquences, un nouveau domaine RNB a été identifié au centre de la protéine HELZ2 (Helicase with Zinc finger 2). Cette protéine de haut poids moléculaire possède deux isoformes : HELZ2 α et HELZ2 β qui contiennent un domaine RNB situé au centre des chaînes polypeptidiques, des domaines de type hélicase SF1, ainsi que deux doigts de zinc pour l'isoforme β . Initialement identifiée en 2002 comme partenaire du récepteur nucléaire PPAR α , HELZ2 a ensuite été retrouvée associée au récepteur nucléaire PPAR γ et à la protéine THRAP3. L'inactivation de HELZ2 chez la souris a permis d'établir un lien *in vivo* entre cette protéine et la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Des souris dépourvues de HELZ2 ont été produites et lorsqu'elles sont soumises à une alimentation riche, l'absence de ce facteur les protège contre la prise de poids et l'obésité. En 2013, un crible visant à identifier les gènes requis pour la fonction antiviral de l'IFN- α (appelés les gènes effecteurs de l'interféron (IEGs)) a permis d'identifier 120 gènes parmi lesquels se trouve HELZ2 (Fusco et al. 2013). Les auteurs ont également montré que l'expression exogène de HELZ2 n'a pas d'effet antiviral. En revanche, lorsque l'expression de HELZ2 est diminuée par l'intermédiaire de shARN ou ARNi, les effets antiviraux de l'IFN- α sont réduits.

Le projet de thèse inclut les caractérisations biochimiques du domaine RNB et des domaines hélicases de la protéine HELZ2. L'autre objectif majeur était de comprendre les mécanismes dans lesquels HELZ2 est impliquée *in vivo*.

Afin d'étudier les fonctions biochimiques de HELZ2, j'ai cherché à produire la protéine HELZ2 β recombinante. De ce fait, la production de protéines GFP-HELZ2 dans les cellules humaines HEK293 a été mise en œuvre. Les protéines ainsi produites ont alors été immunoprécipitées avec des billes GFP-Trap. Après lavages, les complexes billes-protéines ont été utilisés directement dans les différentes expériences afin de caractériser les différentes activités de HELZ2.

Mes analyses ont permis de montrer que les domaines hélicases possèdent une activité ATPase. La capacité de HELZ2 d'ouvrir des duplexes d'acides nucléiques reste à élucider.

J'ai aussi pu démontrer que HELZ2 possède bien une activité ribonucléase *in vitro*. Il a aussi pu être démontré que les protéines GFP-HELZ2 α et β sauvages dégradent le

substrat ARN de 3' en 5' un produit final de 5 nucléotides de long en présence de Mg^{2+} . Une expérience en remplaçant les ions Mg^{2+} par d'autres ions divalents a montré que l'activité ribonucléase de HELZ2 est similaire en présence de Mn^{2+} et est moindre ou totalement absente en présence des autres ions divalents. Ensuite, l'activité de HELZ2 a été testée sur différents substrats ARN. Les résultats préliminaires indiquent qu'il ne semble pas avoir de différence de dégradation de substrats poly A, poly C et poly U.

A l'aide de protéines tronquées, j'ai pu constater que le premier domaine hélicase n'est pas nécessaire à l'activité RNase et que le domaine RNB seul n'est pas capable de dégrader l'ARN *in vitro*. D'autres constructions ont été réalisées qui ont permis d'affirmer que le second domaine hélicase ainsi que le linker présent en 3' du RNB sont nécessaires à l'activité nucléase.

Mes analyses ont aussi permis de montrer que HELZ2 n'est pas capable de dégrader l'ADN *in vitro* Mais j'ai pu mettre en avant sa capacité à lier l'ADN.

Les protéines GFP-HELZ2 possédant l'avantage d'être fluorescentes, j'ai pu montrer que cette protéine est majoritairement cytoplasmique.

Les niveaux d'expression des deux isoformes de HELZ2 ont été étudiés par Western-blot dans plusieurs lignées cellulaires. Les résultats obtenus montraient que la protéine HELZ2 α est présente dans la majorité des lignées testées, tandis que l'isoforme β n'est que visible dans les lignées HeLa, HEK293 et Huh7.

Afin d'identifier des partenaires protéiques de HELZ2, une immunoprécipitation des protéines GFP, GFP-HELZ2 α et β a été réalisée à l'aide des billes GFP-Trap, suivie d'une élution. Cependant, les éluats n'ont pas permis d'identifier de partenaires stables de ces protéines de fusion dans les cellules HEK293.

En conclusion, cette étude a mis en lumière la présence de doigts de zinc, de domaines hélicases capables d'hydrolyser l'ATP en ADP ainsi qu'un domaine RNB dégradant l'ARN *in vitro* et possédant des caractéristiques proches des domaines RNB déjà connus. Ceci permet de lier HELZ2 au métabolisme des ARN et donc d'envisager différemment l'étude de ses rôles décrits dans la littérature. Cette étude fournit les bases pour permettre dans le futur l'identification des cibles ARN de HELZ2 ainsi que la plus ample caractérisation de ses domaines hélicases.

Abstract

Title:

HELZ2, a new human ribonuclease involved in RNA metabolism?

Two types of Ribonucleic Acids (RNAs) are known: messenger RNAs (mRNAs) that are coding RNAs, and non-coding RNAs. RNAs are synthesized in the nucleus from DNA. The mRNAs undergo many post-transcriptional modifications like the addition of a cap at their 5' end and / or polyA tail at their 3' end. If many processing reactions occur in the nuclei, some also occur in the cytoplasm. The mRNAs are then translated into proteins by the ribosome. The machinery of RNA decay which degrades damaged RNAs and those that are no longer needed has been studied for many years. Every step in the life of RNAs can contribute to the control of gene expression in all living organisms. In addition, they allow the establishment of programs for the expression of specific genes.

In humans, dysfunctions in the regulatory pathways of gene expression are associated with genetic diseases and cancers. Ribonucleases are particularly important in these regulatory pathways since they carry the catalytic activity necessary for the maturation/degradation of target RNAs. Characterization of all ribonucleases expressed in human cells, characterization of their partners and their targets is therefore crucial to understand how cells adapt their gene expression programs to extracellular signals.

Ribonucleases of the RNaseII/RNB family are conserved from bacteria to humans and are involved in RNA decay and processing. In humans, three members of this family are currently known: DIS3, DIS3L1 and DIS3L2. At the pathological level, localized mutations in the RNB domain of DIS3 or DIS3L2 are associated with colorectal cancer, melanomas, chronic myeloid leukemia or Wilms tumors depending of which protein is mutated.

Through database search and sequence alignment, a new RNB domain has been identified in HELZ2 protein (Helicase with Zinc Finger 2). This high molecular weight

protein has two isoforms: HELZ2 α and HELZ2 β which contains an RNB domain at the center of the polypeptide chain, two SF1 helicase domains, and two zinc fingers for the β isoform. Initially identified in 2002 as a partner of the PPAR α nuclear receptor, HELZ2 was subsequently found associated with the PPAR γ and the THRAP3 protein. The inactivation of HELZ2 in mice has established an *in vivo* link between this protein and the regulation of energy metabolism. HELZ2^{-/-} mice were produced and the absence of HELZ2 protects them against weight gain and obesity when they are fed with a high fat diet. In 2013, a screen aiming to identify the genes required for the antiviral function of IFN- α (interferon effector genes (IEGs)) identified 120 genes including HELZ2. The authors also showed that the exogenous expression of HELZ2 has no antiviral effect. On the other hand, the inhibition HELZ2's expression via shRNA or siRNA inhibits the antiviral effects of IFN- α .

The thesis project includes the biochemical characterization of the RNB domain and the helicase domains of the HELZ2 protein. The other major goal was to understand the mechanisms in which HELZ2 is involved *in vivo*.

In order to study the biochemical functions of HELZ2, I tried to produce the recombinant HELZ2 β protein. The production of GFP-HELZ2 proteins in HEK293 human cells has been implemented. The proteins thus produced were then immunoprecipitated with GFP-Trap beads. After washes, the beads-protein complexes were used directly in the different experiments to characterize the different activities of HELZ2.

I revealed that the helicase domains display ATPase activity. The ability of HELZ2 to open nucleic acid duplexes remains to be elucidated.

I also demonstrated that HELZ2 does have an *in vitro* ribonuclease activity. Wild-type GFP-HELZ2 α and β proteins degrade the RNA substrate from 3' to 5' and releases a 5 nucleotides long final product in the presence of Mg²⁺.

An experiment replacing the Mg²⁺ ions with other divalent ions has demonstrated that the HELZ2 ribonuclease activity is similar in the presence of Mn²⁺ and is less or completely absent in the presence of the other divalent ions.

Then, the activity of HELZ2 was tested on different RNA substrates. Preliminary results indicate that it does not appear to exhibit any differences in degradation of poly A, poly C and poly U substrates.

Using truncated proteins, I have found that the first helicase domain is not necessary for RNase activity and that the RNB domain alone can't degrade RNA *in vitro*. Using other constructs I demonstrated that the second helicase domain as well as the linker present at 3' of the RNB are necessary for the nuclease activity. I also showed that HELZ2 doesn't degrade DNA *in vitro*. But I was able to highlight its ability to bind DNA. Using the fluorescence of GFP-HELZ2 proteins, I identified this protein as mostly cytoplasmic.

The expression levels of both isoforms of HELZ2 have been studied by Western-blot in several cell lines. The HELZ2 α protein is present in the majority of the lines tested, whereas the β isoform is only visible in the HeLa, HEK293 and Huh7 cell lines.

In order to identify protein partners of HELZ2, immunoprecipitations of GFP, GFP-HELZ2 α and β proteins were performed using GFP-Trap beads, followed by elution. However, the eluates failed to identify stable partners of these fusion proteins in HEK293 cells.

In conclusion, this study has highlighted the presence of zinc fingers, helicase domains capable of hydrolyzing ATP into ADP and an RNB domain that degrades RNA *in vitro* and has characteristics close to the other described RNB domains. This study links HELZ2 to RNA metabolism. Studies of its roles reported in the literature should be reinterpreted with this background information. This study provides the basis for the future identification of HELZ2 RNA targets as well as further characterization of its helicase domains.

Table des matières

Table des matières

Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	14
Liste des annexes.....	17
Liste des abréviations.....	18
1 Introduction.....	22
1.1 Synthèse, maturation, export et traduction des ARN.....	22
1.1.1 Synthèse.....	22
1.1.2 Maturation.....	27
1.1.3 Export.....	36
1.1.4 Localisation.....	36
1.1.5 Traduction.....	37
1.2 La dégradation des ARN.....	41
1.2.1 Dégradation des ARN nucléaires.....	43
1.2.2 Dégradation des ARNm cytoplasmiques.....	45
1.2.3 Contrôle qualité.....	55
1.2.4 Autres mécanismes de dégradation impliquant UPF1.....	59
1.2.5 Dégradation cytoplasmique des ARN non-codants.....	60
1.2.6 Dégradation des ARN exogènes.....	61
1.2.7 Les hélicases et les RNases sont présents tout au long de la vie des ARN	62
2 Matériel et méthodes.....	75
2.1 Matériel biologique.....	75
2.1.1 Souche bactérienne.....	75
2.1.2 Lignées cellulaires.....	75
2.1.3 Vecteurs plasmidiques.....	75

2.2	Biologie moléculaire	76
2.2.1	Clonages	76
2.2.2	Amplification des plasmides.....	77
2.2.3	Mutagenèse par PCR	78
2.2.4	Test T7 endonucléase	78
2.3	Infection des cellules d'insectes par baculovirus	78
2.4	Test d'activité ribonucléase	79
2.4.1	Marquage d'oligonucléotides ADN et ARN	79
2.4.2	Transfections :.....	80
2.4.3	Lyse cellulaire.....	80
2.4.4	Immunoprécipitation des protéines étiquetées.....	81
2.4.5	SDS-Page et western-blot	81
2.4.6	Gel d'acrylamide-urée.....	82
2.5	Test d'activité ATPase.....	83
2.5.1	Immunoprécipitation	83
2.5.2	Chromatographie en couche mince (Thin Layer chromatography (TLC))	83
2.6	Localisation protéique	84
2.6.1	Transfection de cellules HeLa.....	84
2.6.2	Immunofluorescence	84
2.7	Différentiations des cellules hMADS	84
2.7.1	Adipogenèse.....	85
2.7.2	Ostéogénèse	85
2.7.3	Chondrogenèse	86
2.8	Identifications de partenaires protéiques.....	87
2.9	Solutions utilisées.....	87
2.10	Anticorps	89
2.11	Listes des oligonucléotides utilisés.....	90

2.11.1	Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de HELZ2	90
2.11.2	Oligonucléotides utilisés pour les mutagénèses par PCR.....	90
2.11.3	Oligonucléotides utilisés pour les différents clonages de HELZ2.....	91
2.11.4	Oligonucléotides utilisés pour le CRISPR/Cas9.....	92
3	Résultats	94
3.1	HELZ2 un nouvelle RNase humaine de la famille des RNaseII/RNB ?.....	94
3.1.1	Identification d'une nouvelle protéine contenant un domaine RNB potentiel	94
3.1.2	Fonctions de HELZ2	99
3.2	Caractérisation biochimique de HELZ2	103
3.2.1	Production de la protéine recombinante dans les cellules d'insectes ...	103
3.2.2	Production de protéine recombinante GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293.....	106
3.2.3	Essais ATPase	108
3.2.4	Etude <i>in vitro</i> de l'activité nucléase de HELZ2.....	110
3.2.5	GFP-HeZ2 fixe l'ADN <i>in vitro</i>	121
3.3	Etude <i>in cellulo</i> de HELZ2.....	123
3.3.1	Localisation de GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293.....	123
3.3.2	Test de différents anticorps commerciaux anti-HELZ2	126
3.3.3	Expression endogène de HELZ2	127
3.3.4	Etude de l'expression de HELZ2 durant la différenciation de cellules souches dérivées du tissu adipeux.....	129
3.3.5	Tentative de création d'une lignée HELZ2 KO par la méthode CRISPR/Cas9	133
3.3.6	Recherche de partenaires protéiques de GFP-HELZ2	135
4	Discussion et perspectives	139
4.1	HELZ2 est une protéine de grande taille possédant deux activités enzymatiques.....	139

4.1.1	HELZ2 est majoritairement cytoplasmique	141
4.1.2	Les domaines hélicases de HELZ2 hydrolysent l'ATP en ADP.	142
4.1.3	Le domaine RNB de HELZ2 est fonctionnel et ses caractéristiques sont proches des domaines RNB déjà caractérisés.....	143
4.1.4	HELZ2 fixe l'ADN mais le dégrade pas.....	145
4.2	Quel(s) rôle(s) la protéine HELZ2 joue-t-elle dans les cellules ?.....	146
4.2.1	Niveau d'expression de HELZ2 dans différentes lignées cancéreuses	147
4.2.2	Quels sont les partenaires protéiques de HELZ2 ?	147
4.2.3	Rôles de HELZ2 décrits dans la littérature	148
5	Références	152
6	Annexes	184

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LE SEQUENÇAGE DE HELZ2	90
TABLEAU 2 : OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES MUTAGENESES PAR PCR	90
TABLEAU 3 : OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES DIFFERENTS CLONAGES DE HELZ2.....	91
TABLEAU 4 : OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LE CRISPR/CAS9	92

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ASSEMBLAGE SEQUENTIEL DU PIC IN VITRO	24
FIGURE 2 : MODELE TORPEDO DE TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION DES ARNM CHEZ LES EUCARYOTES SUPERIEURS.....	27
FIGURE 3 : SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES D'EPISSAGE PAR LE SPLICEOSOME.....	30
FIGURE 4 :PRINCIPE ET PROTEINES IMPLIQUEES DANS L'ECRITURE, DANS L'EFFACEMENT ET DANS LA LECTURE DE LA MODIFICATION M6A).....	34
FIGURE 5 : REPRESENTATION DES ROUTES MAJEURES D'EXPORT DES DIFFERENTS ARN VERS LE CYTOPLASME.....	35
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION.....	38
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE L'ELONGATION DE LA TRADUCTION	40
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA TERMINAISON DE LA TRADUCTION.....	41
FIGURE 9 : REPRESENTATION DES GRANDES ETAPES DE LA VIE DES ARN DANS UNE CELLULE EUCARYOTE.....	42
FIGURE 10 : ORGANISATION DE L'EXOSOME NUCLEAIRE DE LEVURE. A GAUCHE	44
FIGURE 11 : MODELE DE DESADENYLATION PAR LE COMPLEXE CCR4-NOT HUMAIN.....	47
FIGURE 12 : COMPARAISON DES MECANISMES DE RECRUTEMENT DE DCP2 ET XRN1 SUR DES ARNM EUCARYOTES DESADENYLES.....	53
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODELES PROPOSES POUR LE RECRUTEMENT ET L'ACTIVATION D'UPF1 DURANT LE NMD.....	57
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME DE TRANSLOCATION DES ENZYMES SF1.....	63
FIGURE 15 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES DIFFERENTES FAMILLES D'HELICASES AGISSANT SOUS FORME DE MONOMERE OU DIMERES.....	64
FIGURE 16 : ORGANISATION DE SEQUENCE ET STRUCTURALE DES HELICASE SF1 ET SF2.....	65
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DISPOSITION DES DOMAINES POUR LA PROTEINE UPF1 HUMAINE (HUPF1)..	66
FIGURE 18 : CLASSIFICATION DES DIFFERENTES FAMILLES DE RNASES. DES EXEMPLES PROCARYOTES ET EUCARYOTES SONT DONNES POUR CHAQUE FAMILLE.....	69
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE PROTEINES DE LA FAMILLE RNASEII/RNB.....	71
FIGURE 20 : SCHEMA DES MALADIES HUMAINES QUI ONT ETE LIEE A UNE SUREXPRESSON OU A UN DYSFONCTIONNEMENT DES ENZYMES DE LA FAMILLE RNASEII/RNB.....	72
FIGURE 21 : SCHEMA DU PRINCIPE DE LA METHODE DE L'ENDONUCLEASE T7 POUR EVALUER LA FRACTION DE LOCUS GENOMIQUE MODIFIE	79
FIGURE 22 : PROTOCOLE DE DIFFERENCIATION DES CELLULES HMADS EN ADIPOCYTES.....	86
FIGURE 23 : PROTOCOLE DE DIFFERENCIATION DES CELLULES HMADS EN OSTEOBLASTES.....	86
FIGURE 24 : PROTOCOLE DE DIFFERENCIATION DES CELLULES HMADS EN CHONDROCYTES	87

<i>FIGURE 25 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DES DEUX ISOFORMES DES PROTEINES HUMAINES HELZ2.</i>	94
<i>FIGURE 26 : SEQUENCES DU DOIGT DE ZINC C2H2 DE LA PROTEINE HELZ2 DE DIVERSES ESPECES.</i>	95
<i>FIGURE 27 : SEQUENCES DU DOIGT DE ZINC CCCH DE LA PROTEINE HELZ2 DE DIVERSES ESPECES</i>	96
<i>FIGURE 28 : ALIGNEMENT DES 12 DOMAINES HELICASE HUMAINE DE LA SOUS-FAMILLE UPF1-LIKE</i>	99
<i>FIGURE 29 : ALIGNEMENT DES DOMAINES RNB DES PROTEINES HUMAINES DIS3, DIS3L, DIS3L2 ET HELZ2 AINSI QUE DE LA PROTEINE DIS3 DE LEVURE.</i>	101
<i>FIGURE 30 : PRODUCTION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE HELZ2 B DANS LES CELLULES D'INSECTES</i>	105
<i>FIGURE 31 : PRODUCTION DE LA PROTEINE GFP-HELZ2 DANS LES CELLULES HEK293.</i>	107
<i>FIGURE 32 : TEST IN VITRO D'ACTIVITE ATPASE DE HELZ2B.</i>	110
<i>FIGURE 33 : TEST IN VITRO DE L'ACTIVITE NUCLEASE DE HELZ2B</i>	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<i>FIGURE 34 : TEST IN VITRO DE L'ACTIVITE NUCLEASE DE HELZ2A</i>	114
<i>FIGURE 35 : INFLUENCE DE LA PRESENCE DE DIFFERENTS IONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE HELZ2B.</i>	116
<i>FIGURE 36 : DETERMINATION DES DOMAINES ESSENTIELS A L'ACTIVITE RNASE</i>	119
<i>FIGURE 37 : ETUDE DE LA SPECIFICITE DE SUBSTRAT DE HELZ2.</i>	120
<i>FIGURE 38 : TEST DE LIAISON AUX ACIDES NUCLEIQUES</i>	122
<i>FIGURE 39 : LOCALISATION DES DEUX ISOFORMES DE HELZ2 ET E THRAP3.</i>	124
<i>FIGURE 40 : INFLUENCE DE LA POSITION DE L'ETIQUETTE SUR LA LOCALISATION INTRA-CELLULAIRE.</i>	125
<i>FIGURE 41 : TEST DE RECONNAISSANCE DES ANTICORPS COMMERCIAUX DES PROTEINES GFP-HELZ2 ET HELZ2 ENDOGENE.</i>	127
<i>FIGURE 42 : NIVEAU D'EXPRESSION DES DEUX ISOFORMES PROTEIQUES DE HELZ2.</i>	128
<i>FIGURE 43 : ETUDE DE L'IMPLICATION DE HELZ2 DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HMADS.</i>	131
<i>FIGURE 44 : KNOCK-OUT DU GENE HELZ2 PAR CRISPR/CAS9.</i>	134
<i>FIGURE 45 : IDENTIFICATION DE PARTENAIRES PROTEIQUES DE HELZ2 :</i>	136

Liste des annexes

ANNEXE 1 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES DE LA PROTEINE HELZ2 DE DIFFERSES ESPECES	185
ANNEXE 2 : RESULTATS DE SPECTROMETRIE DE MASSE.....	196

Liste des abréviations

A, T, C, G, U : adénine, thymine, cytosine, guanine, uracile.

Ac, Acl, AclI : anticorps, anticorps primaire, anticorps secondaire

ADN, ADNc: acide désoxyribonucléique, ADN complémentaire

AHR : aryl hydrocarbon receptor

AmpR, KanR : gène de résistance à l'ampicilline, gène de résistance à la kanamycine

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférence

ARNm : ARN messenger

ARNnc : ARN non-codant

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BBP : bleu de bromophénol

BET : bromure d'éthidium

BP : « band pass »

BSA : Albumine sérique bovine

CaCl₂ : Chlorure de Calcium

carbonate de sodium, bicarbonate de sodium

CIP : phosphatase alcaline intestinale de veau

cryo-EM : Cryo-microscopie électronique

CSD : « cold shock domain »

C-ter : extrémité C-terminale

DAM549 : anticorps « donkey anti-mouse » couplé au Dylight549

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNasique : désoxyribonucléique

DTT : dithiothréitol

E.coli : Escherichia coli

ECL : « enhanced chemiluminescence »

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

FCS : sérum de veau foetal

GAM-PO : anticorps « goat anti mouse » couple à la HRP

GFP : « green fluorescent protein »

gravitationnelle, kilodalton, paire de bases, potentiel hydrogène, degré Celsius

HA, FLAG: hémagglutinine, DYKDDDDK

HA1.1 : anticorps anti-HA

hDis3, Rrp44 : « chromosome DISjunction » humaine, Ribosomal RNA-processing protein 44

hDis3L1, hDis3L2 : « hDis3 Like protein 1 », « hDis3 Like protein 2 »

HEK293 : cellules embryonnaire humaine de rein

HeLa WS : Cellules Henrietta Lacks

HELZ2 : Helicase with Zinc Finger 2

HRP : peroxydase de raifort

IGBMC : institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

IP : immunoprécipitation

IPP150 : tampon de lyse avec 150mM de NaCl

ISG : interferon-stimulated gene

IEG : gènes effecteurs de l'interféron

JL-8 : anticorps anti-GFP

KCl, KH₂PO₄: Chlorure de potassium, Phosphate de potassium monobasique

LB : « lysogeny broth »

Lepr : récepteur à la leptine

lncRNA : ARN long non-codant

M2 : anticorps anti-FLAG

Mg²⁺ : cation divalent magnésium

MH1 : souche d'*E.coli*

miARN : micro ARN

millilitre, molaire, millimolaire, Volt, microgramme, rotation par minute, force

Mn²⁺ : cation divalent manganèse

NaCl, Na₂HPO₄, NaCO₃, NaHCO₃: Chlorure de sodium, Hydrogénophosphate de sodium,

NGD : No Go Decay

NLS : signal de localisation nucléaire

NMD : Nonsense-Mediated Decay

NP-40 : nonyl phenoxy polyethoxy ethanol

NSD : Non-Stop Decay

nt, nts : nucleotide, nucléotides

N-ter : extrémité N-terminale

PBS, PBS-T : tampon phosphate salin, PBS-Tween20

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PDIP-1 : PPAR DBD interacting protein 1

PFA: paraformaldéhyde

PM : poids moléculaire

PNK : « polynucleotide kinase »

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PRIC285 : Peroxisomal Proliferator Activated Receptor A Interacting Complex 285

protéine MS2 : protéine de l'enveloppe du phage MS2

RNase : ribonucléase

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium

snARN : petits ARN nucléaires

snoARN : petits ARN nucléolaires

TAG : triacylglycérol

TBE : Tris borate EDTA

THRAP3 : Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein 3

Unités : h, min, cm, mL, M, mM, V, µg, rpm, g, kDa, pb, pH, °C: heure, minute, centimètre,

UV : Ultraviolet

1. Introduction

1 Introduction

Le dogme fondamental de la biologie moléculaire décrit l'ADN comme le support stable de l'information génétique, à l'exception de quelques virus dont le génome est de l'ARN. Dans le génome humain cette information est stockée dans 20 000 à 25 000 gènes. Elle est recopiée sous forme d'ARN lors de la transcription. Ces ARN peuvent avoir un rôle non-codant ou codant. Ces derniers sont appelés les ARN messagers (ARNm). Après avoir subis de nombreuses modifications et avoir été exportés dans le cytoplasme, les ARNm sont traduits en protéines. Les ARN qui ne sont plus nécessaires ou qui sont défectueux sont dégradés par des enzymes appelées ribonucléases (RNase). La régulation de tous les processus de la voie d'expression des gènes, incluant ceux modifiant et dégradant les ARN, permet aux organismes d'ajuster précisément la production de protéines. L'expression des gènes nécessite une régulation fine car elle diffère à chaque étape du cycle cellulaire, en fonction de l'âge de l'organisme, au cours de la différenciation cellulaire, et dans chaque tissu... L'expression génique doit aussi être modifiée rapidement afin de permettre l'homéostasie, de répondre à un stress ou à un signal émis par d'autres cellules. Dans cette introduction, les différentes étapes de la vie des ARN chez l'homme seront rappelées. Cependant, de nombreuses études ont été réalisées sur d'autres organismes modèles comme la levure et seront citées lorsque qu'elles décrivent des mécanismes probablement conservés chez l'homme.

1.1 Synthèse, maturation, export et traduction des ARN

1.1.1 Synthèse

1.1.1.1 Initiation

La synthèse d'une molécule d'ARN à partir d'une molécule d'ADN, aussi appelée transcription, a été observée pour la première fois en 1959 (Weiss et Gladstone 1959). Ultérieurement, des études biochimiques ont permis d'identifier les protéines responsables de cette activité. Chez les mammifères, trois complexes protéiques ont été identifiés et appelés les ARN polymérases (Pol) I, II et III. La spécificité de chacun de ces complexes a été étudiée entre autre par le laboratoire de P. Chambon et R. Roeder (Kedinger et al. 1970; Gniazdowski et al. 1970; Weinmann et Roeder 1974). Il a été déterminé que la Pol I permet la synthèse des ARN ribosomique (ARNr) à

l'exception de l'ARNr 5S qui est synthétisé par la Pol III. Cette dernière est aussi responsable de la transcription de nombreux ARN non-codant (ARNnc) comme les ARN de transfert (ARNt) et certains micro-ARN (miARN). Quant à la Pol II elle assure principalement la transcription des ARNm. La particularité de la Pol II réside dans la présence d'un motif particulier sur le domaine C-terminal (CTD) à l'extrémité de sa sous-unité catalytique. Ce motif peut contenir jusqu'à 52 répétitions du motif : Tyr 1-Ser 2-Pro 3-Thr 4-Ser 5-Pro 6-Ser 7. De nombreuses modifications de ce domaine permettent une régulation de la transcription.

La transcription se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La transcription des gènes par la Pol II chez les eucaryotes supérieurs est présentée comme exemple. L'initiation est amorcée par la formation du complexe de pré-initiation (PIC). Ce modèle résulte de l'interaction séquentielle des différents facteurs généraux de la transcription ainsi que la Pol II avec certains éléments du promoteur (Figure 1). La formation du PIC débute par la fixation de la TATA-Binding Protein (TBP) sur la boîte TATA qui se situe entre 25 et 30 nucléotides en amont du site de départ de la transcription. La TBP lie les TBP Associated Factors (TAFs) afin de constituer le complexe TFIID. Ensuite, le facteur TFIIA vient stabiliser l'interaction entre la TBP et la boîte TATA. Le facteur TFIIIB est alors recruté et stabilise le complexe précédent. Ce facteur interagit la TBP mais aussi avec l'ADN et plus précisément avec une séquence BRE qui peut être retrouvée en amont ou en aval de la boîte TATA. L'étape suivante de ce modèle consiste au recrutement du facteur TFIIIF. Ce dernier possède une forte affinité pour la Pol II qui est recrutée concomitamment. Les dernières étapes de la formation du PIC sont les recrutements de TFIIIE suivi de TFIIH. Ce dernier possède une activité hélicase nécessaire à l'ouverture des deux brins d'ADN créant ainsi la bulle de transcription. Ce modèle dérive essentiellement d'études *in vitro* et il est important de noter que la formation du PIC *in vivo* est plus complexe dû à l'intervention de nombreux co-activateurs intervenant à différentes étapes. De nombreux facteurs de transcription ainsi que des cofacteurs sont ainsi recrutés sur des régions régulatrices situées en amont du promoteur appelées « enhancers » et influent sur la formation du PIC et le recrutement de Pol II (Haberle et Stark 2018). En parallèle de la formation du PIC, des modifications de la chromatine ont lieu pour permettre l'initiation de la transcription. Les histones qui composent les nucléosomes peuvent subir des modifications post-traductionnelles ayant une influence considérable sur la

régulation de l'expression génique. Par exemple, la méthylation de la K4 de l'histone H3 est associée à une activation de la transcription. Au contraire, une méthylation de la K27 de cette même histone réprime la transcription (B. Li, Carey, et Workman 2007). Il existe aussi des variants d'histones qui peuvent remplacer l'un des histones canoniques et ainsi modifier la stabilité de la chromatine et influencer la transcription.

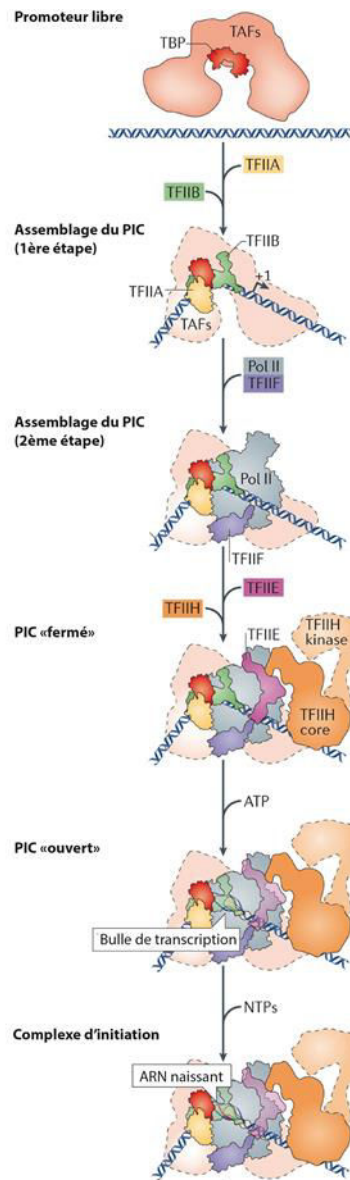


Figure 1 : Représentation schématique de l'assemblage séquentiel du PIC in vitro (Sainsbury, Bernecky, et Cramer 2015).

L'étape qui suit la formation du PIC est l'élongation. Lors de cette transition, des modifications du PIC et de la Pol II permettent l'échappement de cette dernière du

promoteur. La phosphorylation du CTD de la Pol II sur la sérine 5 est nécessaire à son avancement. On observe fréquemment la production et la libération d'ARN de 5 à 10 nucléotides : on parle alors d'élongation abortive. Lorsque les transcrits atteignent 10 nucléotides de longueur, la bulle de transcription se déplace et on parle alors d'échappement du promoteur. Ceci marque le début d'une phase d'élongation processive.

Après le départ en élongation de la Pol II, il a été observé que certains facteurs restent sur le promoteur. Ce complexe forme une plateforme permettant de faciliter la ré-initiation en permettant un recrutement plus rapide des facteurs de transcription manquant pour initier un nouveau cycle de production d'ARN.

1.1.1.2 Elongation

Il a été montré que l'élongation se déroule en deux temps : la phase précoce puis la phase tardive.

Durant la phase d'élongation précoce la Pol II marque une pause à environ 20-60 nucléotides après le site de départ de la transcription. Cette pause est plus ou moins longue selon les gènes. Les facteurs DSIF et NELF s'associent à la Pol II durant ces pauses. Cette étape ajoute un point de régulation supplémentaire du niveau de transcription d'un gène soit en permettant une activation plus rapide, soit en limitant le taux de transcription. Plusieurs modifications dont la phosphorylation de la Ser2 du CTD de la Pol II ont pour effet la résolution de la pause ainsi que le recrutement de facteurs d'élongation (Kwak et Lis 2013).

Après la résolution de la pause, la Pol II entre phase d'élongation tardive dite productive. Cette phase est caractérisée par le déplacement de la bulle de transcription sur l'ADN qui s'ouvre au fur et à mesure couplé à la polymérisation de l'ARN. Cette dernière est permise par l'incorporation de nucléotides triphosphates avec création de liaisons phosphodiester. La vitesse de la Pol II est d'environ 0.5 kb/min durant les premiers kb et atteint une vitesse de 2 à 5 kb/min après 15 kb (Jonkers et Lis 2015). Cette accélération est probablement due à l'accumulation graduelle des complexes associés ainsi qu'à la modification graduelle de la Pol II (Jonkers et Lis 2015).

Durant cette phase d'élongation, les ARN subissent de nombreuses modifications comme l'ajout d'une coiffe ainsi que l'épissage. Les mécanismes responsables de ces différentes modifications ainsi que leur rôle seront exposés dans la partie 1.1.2.

1.1.1.3 Terminaison

Le cycle de transcription se termine par la terminaison. Cette dernière étape définit la fin du transcrit. Elle a pour conséquence d'empêcher l'interférence avec les gènes situés en aval. La terminaison est définie par la libération de la polymérase, l'ADN et l'ARN. Il est connu que la terminaison est dépendante de l'ajout d'une queue poly(A) à l'ARN néo-synthétisé (Birse et al. 1998). Il a ainsi été démontré que l'arrivée sur le signal de poly(A) a pour effet de ralentir le complexe d'élongation. Ensuite, le complexe CPSF (facteur de spécificité de clivage et polyadénylation) se lie à la Pol II. Les complexes Cstf (facteur stimulateur du clivage) et CFI-CFII (facteur de clivage I and II) se lient au CTD de Pol II contenant des sérines 2 phosphorylées. Ces trois complexes forment le complexe de polyadénylation dont le rôle est décrit en 1.1.2.3. Le signal de polyadénylation : AAUAAA ainsi qu'un motif riche en G/U sont reconnus par les complexes CPSF et CstF. Ceci entraîne ensuite un clivage endonucléolytique par un composant du complexe CPSF (CPSF73) entre ces deux éléments. La maturation de l'extrémité 3' de l'ARNm appelée polyadénylation commence alors et sera décrite dans le paragraphe 1.1.2.3.

Il a été montré que Sen1, l'homologue de l'hélicase sénataxine (SETX) chez la levure, participe à la terminaison de la transcription. Une étude a démontré que le domaine d'hélicase de Sen1 est suffisant pour dissocier le complexe d'élongation *in vitro*, que la protéine entière et son domaine hélicase sont capables de migrer le long d'ARN et d'ADN simple brin dans le sens 5' à 3' (Han, Libri, et Porrua 2017). La même étude a aussi montré que Sen1 est une enzyme relativement peu processive, impliquant un recrutement à proximité de la Pol II pour une terminaison efficace. De plus Sen1, favorise la translocation vers l'avant de polymérases bloquées en agissant sur le transcrit naissant et est suffisante *in vitro* pour induire la terminaison (Han, Libri, et Porrua 2017). Récemment, une étude a mis en évidence la présence d'une bulle de transcription en partie ré-enroulée lors de la terminaison induite par Sen1 (S. Wang et al. 2019).

L'ARN résiduel non-coiffé est dégradé par l'exoribonucléase Xrn2. Un modèle propose que la dégradation de cet ARN résiduel entraîne le détachement de la Pol II terminant ainsi la transcription. Ce modèle est appelé modèle torpédo (Figure 2) (M. Kim et al. 2004; West, Gromak, et Proudfoot 2004).

On peut noter qu'il existe deux enzymes appartenant à la famille XRN: Xrn1, localisée principalement dans le cytoplasme dont le rôle sera discuté ci-dessous et Xrn2 dans le noyau de la cellule. Ce sont des exoribonucléases 5'-3' processives dépendantes de Mg^{2+} ayant une préférence pour l'ARN non structuré simple brin portant un monophosphate à l'extrémité 5' (Jones, Zabolotskaya, et Newbury 2012).

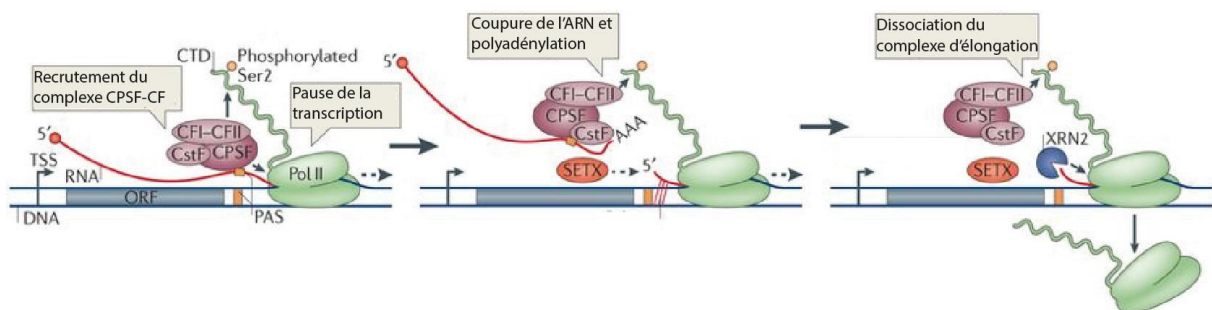


Figure 2 : Modèle torpédo de terminaison de la transcription des ARNm chez les eucaryotes supérieurs. (Porrúa et Libri 2015).

Un autre modèle de terminaison de la transcription a été proposé, il suggère des changements de conformation de la Pol II après polyadénylation, déstabilisant le complexe d'élongation, ce qui a pour effet l'arrêt de la transcription.

Un autre mode de terminaison a été mis en évidence pour les petits ARN nucléaires qui ne possèdent pas de poly(A). Lors de la terminaison de leur transcription, les complexes NELF et INT vont être recrutés sur une séquence appelée 3' box et le complexe INT va induire un clivage de l'ARN puis la dissociation de la Pol II (Porrúa et Libri 2015).

1.1.2 Maturation

Les ARN sont généralement produits sous une forme immature qui est fréquemment non-fonctionnelle. En effet, afin de réaliser leurs fonctions qu'elles soient codantes ou non, les ARN nécessitent communément d'être modifiés. Pour cela ils passent par des

étapes de maturation qui peuvent être co-transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles.

1.1.2.1 Ajout d'une coiffe en 5' (« Capping ») et son rôle

Au début de la phase d'élongation, tous les ARN transcrit par la Pol II subissent l'ajout de la coiffe 7-méthylguanosine (m7G) au niveau du premier nucléotide du transcrit. La phosphorylation au niveau de la sérine 5 du CTD de l'ARN Pol II, joue un rôle important dans ce processus en permettant le recrutement de la guanine-7-méthyltransférase (Ho et Shuman 1999). Cette modification est aussi responsable du recrutement et de l'activation du complexe enzymatique qui permet l'ajout de la coiffe appelé « mRNA-capping enzyme ». Dans un premier temps, cette enzyme génère une extrémité 5' di-phosphate sur le premier nucléotide du transcrit naissant en retirant un phosphate. Ensuite, à l'aide d'un donneur GTP, une GMP est ajoutée à ce di-phosphate par liaison 5'-5' triphosphate. Un groupement méthyl est alors ajouté au résidu N7 de la guanine.

Le CBC (« cap binding complex ») et le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E) sont les complexes majeurs qui reconnaissent la coiffe m7G. Le CBC est constitué des protéines NCBP1 et NCBP2. Elle a aussi pour effet de faciliter l'épissage du premier intron et l'export des ARN du noyau vers le cytoplasme (Galloway et Cowling 2019). Il a aussi été montré que la coiffe permet une meilleure initiation de la traduction des ARNm. La coiffe permet de marquer les ARNm comme « soi » afin de les différencier des ARN exogènes et ainsi les protéger du système immunitaire inné (Galloway et Cowling 2019). L'élimination de la coiffe sera traitée dans le paragraphe 1.2.2.

Un autre type de coiffe a été découvert, cette coiffe est appelée « nicotinamide adenine dinucleotide » (NAD). Initialement identifié chez les bactéries et la levure (Y. G. Chen et al. 2009; Cahová et al. 2015), cette modification a aussi été décrite dans les cellules HEK293. Les ARNm possédant une coiffe NAD sont ciblés par la machinerie de dégradation (Jiao et al. 2017).

Un complexe cytoplasmique responsable de l'ajout d'une coiffe en 5' a aussi été mis en évidence. Cela permet de « recoiffer » des ARN qui ont perdu leur coiffe soit par les enzymes de décapping soit par clivage endonucléasique. Dans les cellules de mammifère cette réaction est réalisée par un métabolon constitué d'une kinase 5'-monophosphate qui va générer un substrat diphosphate. Ce dernier permet l'activité

de la guanylyltransférase de RNGTT (RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase) et de la RNMT (guanine-N7 cap methyltransferase), permettant la méthylation de la guanosine en N7. (Trotman et Schoenberg 2019).

1.1.2.2 Epissage

La plupart des gènes codant pour les ARNm et les ARNt comportent des introns entre les exons où l'information génétique est présente. Le processus permettant de retirer les introns en ligant les exons les uns aux autres est appelé l'épissage. L'épissage des ARNm qui est décrit ci-dessous est réalisé de manière co-transcriptionnelle. Ce processus permet de diversifier le protéome car il permet de produire différentes protéines à partir d'un gène. La réaction d'épissage est assurée par un complexe appelé le spliceosome. Il est composé de plus de 200 protéines qui peuvent être associées ou non à des snARN (small nuclear ribonucleic acids). Le spliceosome existe sous deux formes appelées spliceosome majeur et mineur. La formation du spliceosome majeur est séquentielle et débute par la reconnaissance des séquences cibles de l'ARN à épisser par les snRNP U1 et U2 formant ainsi le complexe A. Ces séquences sont principalement les sites d'épissage 5' et 3', situés de part et d'autre de l'intron, ainsi que le point de branchement. L'étape suivante, à savoir le recrutement de la tri-snRNP U4-U6-U5, permet de constituer le complexe B. Des modifications structurales et conformationnelles, comme la libération d'U1 et U4, permettent à ce complexe d'acquérir une activité catalytique. Il est alors appelé complexe B*. La première étape de la réaction d'épissage a ensuite lieu et entraîne la formation du complexe C où on note la présence de l'exon 1 libre et d'un intermédiaire nucléique intron en lasso-exon2. Une seconde étape de trans-estérification permet de lier les exons mis bout à bout et l'intron en lasso est relargué. Les snRNP U2, U5 et U6 sont ensuite libérées et recyclées (Figure 3) (Matera et Wang 2014).

Le spliceosome mineur utilise quant à lui les snRNP U11, U12, U4atac, U5 et U6atac et cible environ 1% des introns. Les introns reconnus par ce complexe sont enrichis au sein des gènes impliqués dans des mécanismes cellulaires tels que la réplication et la réparation de l'ADN ou la transcription (Dujardin et al. 2016).

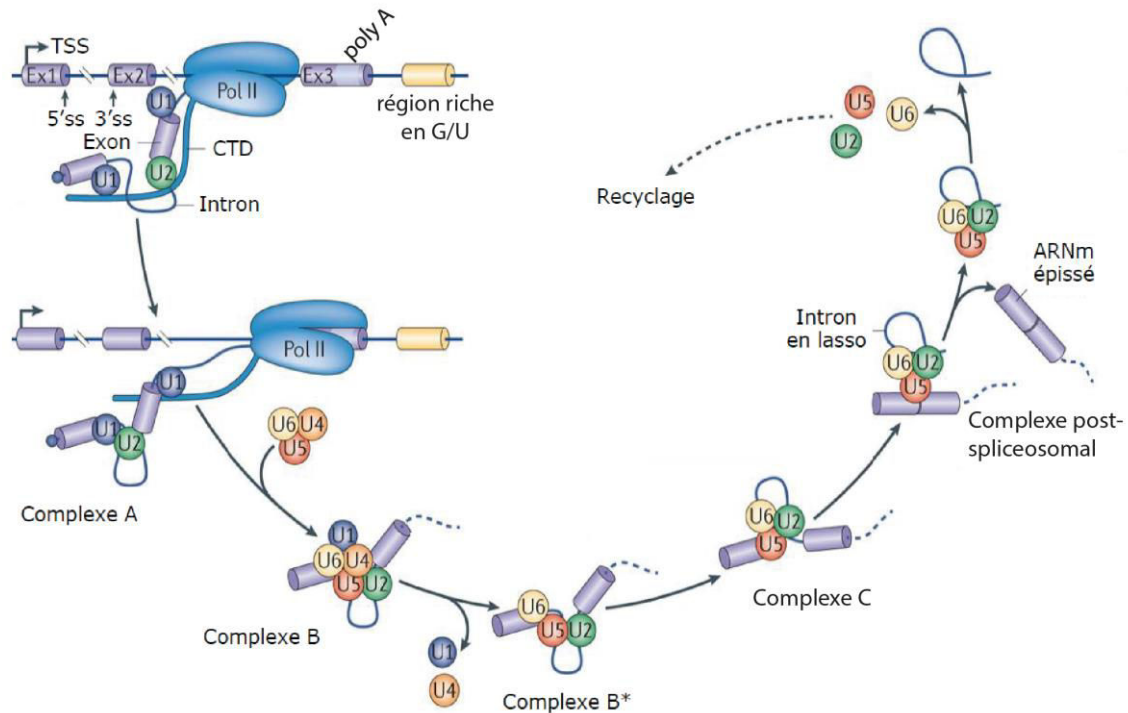


Figure 3 : Schéma des différentes étapes d'épissage par le spliceosome. L'ARN pré-messager en cours de transcription ainsi que les différents complexes permettant son épissage sont représentés. L'ARNm épissé et l'intron en lasso sont les produits finaux (Matera et Wang 2014).

Les protéines SR (riches en sérines et arginines) et les hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) sont capables d'influencer l'épissage ainsi que de favoriser ou de réprimer respectivement l'inclusion d'un exon. On appelle ce processus l'épissage alternatif. Grâce à ce processus, un pré-ARNm peut engendrer une multitude de protéines différentes, ce qui est un facteur clé de la complexité des eucaryotes.

Chez les eucaryotes supérieurs, un complexe protéique appelé EJC (exon-exon junction complex), est déposé sur l'ARNm à environ 20-24 nucléotides en amont des jonctions exon-exon (Hervé Le Hir et al. 2000). L'EJC est déposé par le spliceosome sur les ARNm et reste fixé sur ce dernier jusque dans le cytoplasme.

Le cœur de ce complexe est composé de l'hélicase eIF4A3 et des protéines Y14, MAGOH, MAGOH B, et MLN51 (Ballut et al. 2005; Tange et al. 2005). Ce complexe joue un rôle dans de nombreux processus comme l'export des ARNm vers le cytoplasme (H. Le Hir et al. 2001) ou la traduction. L'EJC joue aussi un rôle primordial dans la voie de dégradation appelée NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay). En effet, sa présence en aval d'un codon de terminaison précoce de la traduction permet

à lui seul de déclencher le recrutement de la machinerie du NMD et ainsi de dégrader l'ARNm (décrit plus amplement en 1.2.3.3.1) (Le Hir, Saulière et Wang 2016).

1.1.2.3 Poly-adénylation

Chez les eucaryotes supérieurs des queues poly(A) sont ajoutées en 3' des ARNm. Comme indiqué dans le chapitre traitant de la terminaison de la transcription, le complexe CPSF-CF reconnaît des motifs dont le signal de polyadénylation AAUAAA. Lors de l'étape suivante, la poly(A) polymérase (PAP) est recrutée. Ensuite, un clivage est réalisé après le site de polyadénylation situé dans le 3' UTR (Untranslated Transcribed Region) permettant l'initiation de la polyadénylation qui est catalysée par la PAP. Chez les mammifères, la PAP est composée de trois domaines : le domaine catalytique, un domaine central, et un domaine de liaison à l'ADN. La PAP forme un complexe avec des protéines du complexe CPSF ainsi que la protéine PABPN1 qui confère sa grande processivité à la réaction de poly-adénylation (Martin, Doublé, et Keller 2008). Il a été proposé que chaque chaîne de PABPN1 se lie à 12–15 adénines et lorsqu'un nombre suffisant de molécules de PABPN1 est lié, des facteurs stériques entraînent la dissociation de la PAP (Keller et al. 2000; Porrua et Libri 2015).

Il existe aussi des événements de polyadénylation alternatifs (APA) qui touchent 70% des gènes codant pour des ARNm chez les mammifères (Tian et Manley 2017). Ils permettent de générer des isoformes présentant des extrémités 3' UTR de longueurs différentes ce qui contribue à la complexité du transcriptome. Les séquences 3' UTR plus longues peuvent contenir des sites cibles des protéines liant les ARN appelés RBP (RNA-binding protein), des miARN ou des lncRNA (« long non-coding RNA »). Ceci peut avoir un impact sur la stabilité, la traduction, l'export et la localisation de l'ARNm mais aussi sur la localisation de la protéine codée par cet ARNm.

Lorsqu'un événement de polyadénylation alternatif a lieu en amont du dernier exon, cela a pour effet d'entraîner la production d'une isoforme protéique différente de la forme canonique (Tian et Manley 2017).

La queue poly(A) permet la fixation des protéines PABP qui protègent les ARNm de la dégradation par les exonucléases 3'-5' dans le cytoplasme. La queue poly(A) joue également un rôle dans l'export vers le cytoplasme. Enfin, la polyadénylation des ARNm est nécessaire à leur traduction.

1.1.2.4 Uridylation

Sept nucléotidyltransférases d'ARN non canoniques ont été identifiées chez l'Homme. Certaines ajoutent préférentiellement de l'uridine au lieu de l'adénine à l'extrémité 3' des ARN. Elles ont été nommées uridylyltransférases terminales (TUTases) ou poly (U) polymérases (PUP).

Trois TUTases ont été identifiées chez les mammifères et sont responsables de l'uridylation de l'extrémité 3' de certains ARN. Les TUTases sont principalement cytoplasmiques à l'exception de la TUTase-1 qui est nucléaire (Menezes, Balzeau et Hagan 2018). La TUTase-1 humaine est responsable de l'uridylation du snARN U6 dans le noyau, ce qui est nécessaire à sa stabilité et à la production du snRNP U6 mature, fonctionnel et compétent pour l'épissage (Trippe et al. 2006). Certains miARN sont aussi soumis à des uridylation pouvant influencer leur biogénèse. La monouridylation favorise le traitement Dicer de précurseurs de microARN du groupe II et la polyuridylation de certains précurseurs microARN bloque leur biogénèse (Menezes, Balzeau et Hagan 2018).

Les Uridylyl Transferases cytoplasmiques TUT4 et TUT7 sont capables d'uridyler les ARNm ainsi que des ARN non-codants. L'uridylation des ARNm poly adénylés permet leur dégradation rapide par l'exonucléase Dis3L2 (Lim et al. 2014; Heo et al. 2009; Menezes, Balzeau, et Hagan 2018). Cette voie de dégradation est décrite en 1.2.2.2.2

1.1.2.5 Edition

La modification d'un nucléotide dans un ARN a été rapportée pour la première fois en 1987 (Powell et al. 1987). L'enzyme APOBEC1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1) a été décrit comme étant responsable de la conversion d'une cytidine en uridine dans l'ARNm codant ApoB (apolipoprotéine B). Cette conversion a pour effet de créer un codon stop précoce et donc une protéine plus courte. L'édition des ARN médiée par APOBEC1 est impliquée dans le maintien de l'homéostasie dans le foie et l'intestin (Kung, Maggi, et Weber 2018).

La famille d'enzyme ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) est capable de transformer une adénine en inosine. L'inosine n'est pas une base classique mais elle sera lue comme une guanosine par la machinerie cellulaire, dont le ribosome. L'édition des ARN médiée par les protéines ADAR semble jouer un rôle crucial dans la

régulation de la réponse immunitaire innée à une infection. (Pujantell et al. 2017; Kung, Maggi, et Weber 2018).

L'édition d'une uridine en cytidine a été observé dans le gène WT1 (Wilm's tumor susceptibility) mais les mécanismes impliqués dans cette conversion ne sont pas connus (Sharma et al. 1994).

1.1.2.6 L'épitranscriptome

Les modifications des ARN jouent un rôle dans presque tous les aspects de leur cycle de vie, y compris l'épissage, l'exportation nucléaire, la stabilité de l'ARNm et la traduction. L'identification et la caractérisation des protéines impliquées dans le dépôt («écriture»), la liaison («lecture») et la suppression («effacement») des modifications de l'ARN ont suggéré que certaines modifications de l'ARNm sont réversibles et donc potentiellement régulées dynamiquement par des événements de signalisation (Zhao, Roundtree, et He 2017).

1.1.2.6.1 N⁶-méthyladénosine (m6A)

La N⁶-méthyladénosine est une modification post-transcriptionnelle répandue dans l'ARNm de mammifère (0.1–0.4% de toutes les adénosines) (Zhao, Roundtree, et He 2017). Cette modification présente dans 25% des transcrits humains est enrichie en séquences consensus dans de longs exons, des codons proches du stop et au niveau des régions 3' UTR (Dominissini et al. 2012).

La m6A est la première modification confirmée de l'ARNm possédant des méthyltransférases, des déméthylases et des protéines de liaison (effectrices) dédiées. À ce jour, Un complexe m6A méthyltransférase composé de METTL3 et 14 plus leurs cofacteurs a été identifié. L'autre protéine connue responsable de l'écriture du m6A est METTL16. Deux déméthylases m6A, à savoir FTP et ALKBH5, sont responsables de l'effacement et plusieurs protéines de liaison à m6A contenant des domaines YTH ou d'autres domaines de liaisons à l'ARN ont été identifiés chez des mammifères (Figure 4) (Shi, Wei, et He 2019).

Cette modification exerce ses effets en recrutant directement des protéines effectrices ou en modulant les structures secondaires de l'ARN. La m6A joue un rôle régulateur dans de nombreux processus cellulaires, notamment la maintenance du rythme circadien, la différenciation des cellules souches et les réponses au stress en régulant

le métabolisme des transcrits des facteurs de transcription clés ainsi que la réponse immunitaire (Zhang, Fu, et Zhou 2019).

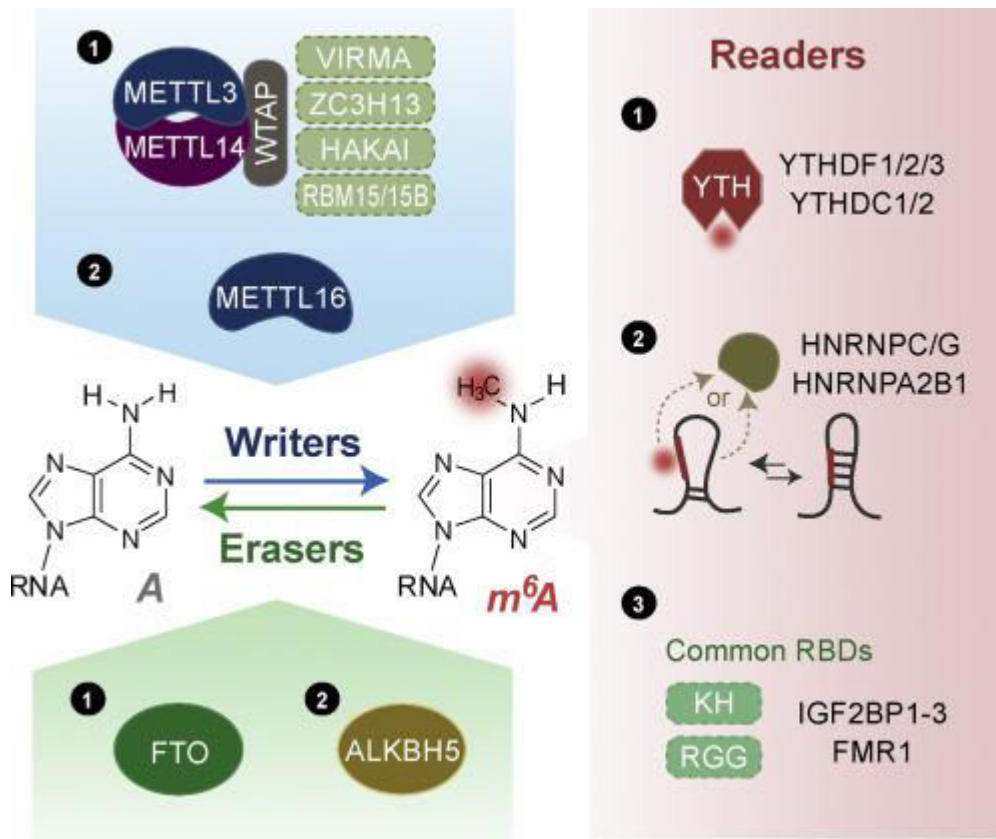


Figure 4 :Principe et protéines impliquées dans l'écriture (en bleu), dans l'effacement (en vert) et dans la lecture de la modification m6A (Figure de Shi, Wei, et He 2019).

1.1.2.6.1.1 Les autres modifications de l'ARN

De nombreuses autres modifications chimiques post-transcriptionnelles ont été détectées dans tous les ARN. Parmi elles on peut citer les méthylations des bases ou du ribose ou encore la pseudo-uridylation. Par exemple, juste après la coiffe m7G, les deux premiers ribonucléotides des transcrits peuvent parfois subir une 2'-O-méthylation par les enzymes hMTr1 et hMTr2 (Werner et al. 2011). L'étude de la modification 5-Methylcytosine (m5C) dans les ARNm est aussi en plein essor ces dernières années. Des rôles de cette modification dans la régulation de l'export nucléaire et dans la traduction des ARNm ont été décrits (Trixl et Lusser 2019).

On note aussi que les ARNt sont les cibles de nombreuses modifications chimiques. Elles aident au bon repliement de l'ARNt et modulent les interactions ARNt:ARNm. Il a aussi été montré que les modifications des ARNt jouent un rôle dans la génération et l'activité des fragments d'ARNt. Les modifications peuvent à la fois protéger l'ARNt du clivage ou au contraire le favoriser (Lyons, Fay, et Ivanov 2018).

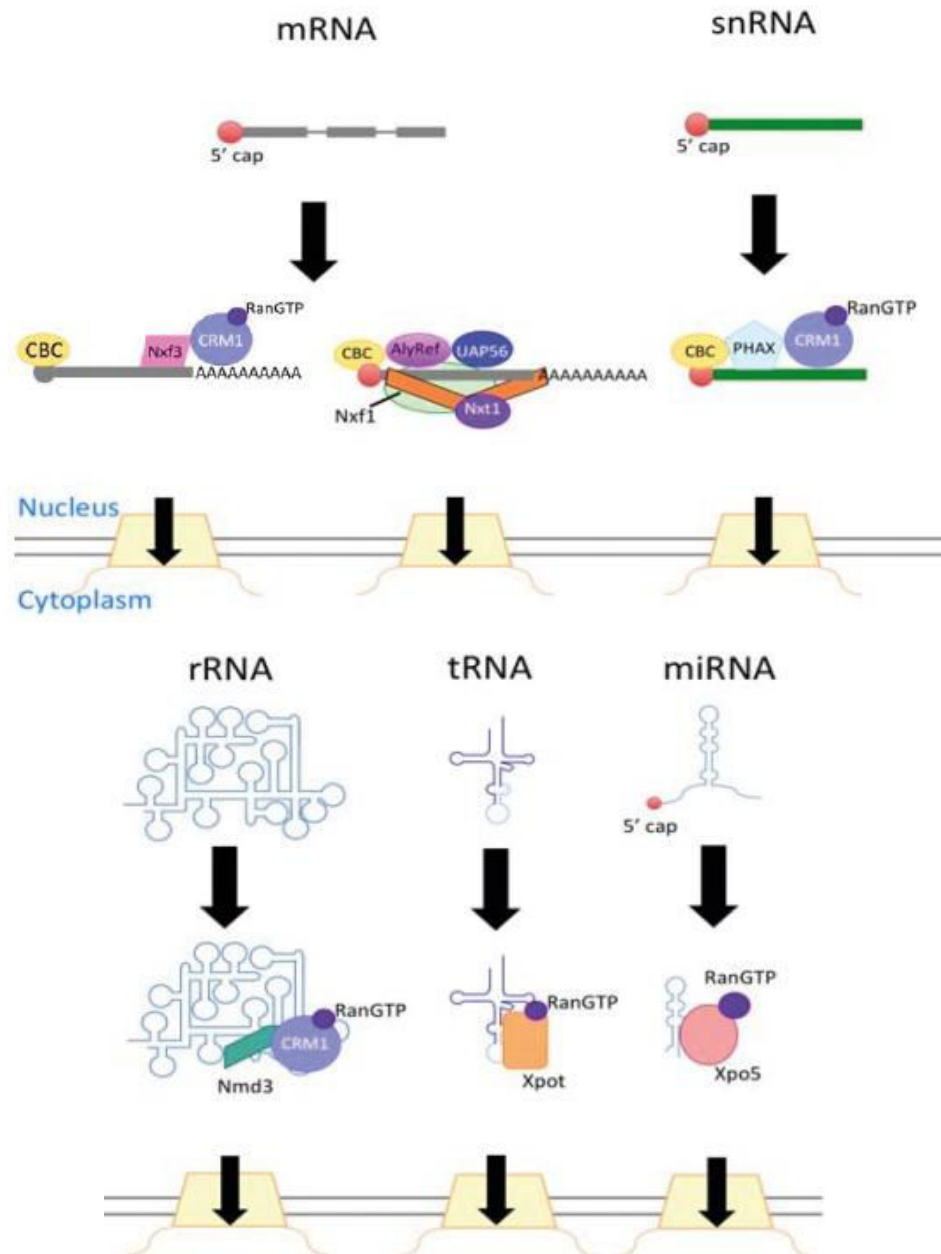


Figure 5 : Représentation des routes majeures d'export des différents ARN vers le cytoplasme. (D'après Okamura, Inose, et Masuda 2015)

1.1.3 Export

Certains ARN comme les ARNm, les ARNt ou les ARNr exercent leurs rôles dans le compartiment cytoplasmique. La transcription des ARN eucaryotes ainsi que la plupart des étapes de maturation se passent dans le noyau. Il est donc nécessaire d'exporter les ARN correspondants vers le cytoplasme. Ce processus nécessite de franchir l'enveloppe nucléaire. Ceci est possible en passant à travers des complexes d'environ 125MDa appelés pores nucléaires (NPC). Ces NPC possèdent une symétrie octogonale et sont constitués d'un « panier nucléaire », d'un canal de transport central et de huit fibrilles cytoplasmiques. Plusieurs mécanismes d'exports des ARNm sont connus : le mécanisme dépendant de Nxf1 et les mécanismes dépendants de Crm1. Des complexes comme le CBC permettent le recrutement des différentes protéines permettant l'export. La protéine Crm1 est associée à une protéine Ran-GTP dont l'hydrolyse du GTP apporte l'énergie permettant la libération de l'ARNm dans le cytoplasme.

Certains ARNnc sont aussi exportés vers le cytoplasme. Pour cela, plusieurs mécanismes sont utilisés, cependant ils ont tous pour point commun l'utilisation d'une exportine couplée à une protéine Ran-GTP (Figure 5).(Okamura, Inose, et Masuda 2015)

1.1.4 Localisation

Une fois dans le cytoplasme, certains ARNm ne sont pas directement traduits, ils sont tout d'abord déplacés jusqu'à l'endroit voulu (Buxbaum, Haimovich, et Singer 2015). Ce processus est appelé le trafic d'ARN et est important pour le contrôle de l'organisation cellulaire. La localisation de l'ARN est généralement dictée par des facteurs de régulation agissant en trans, notamment les protéines de liaison à l'ARN qui reconnaissent des séquences spécifiques présentes sur l'ARN agissant en cis au sein des transcrits d'ARN. Ces séquences spécifiques sont appelées « Zipcodes » et peuvent être retrouvées dans tout l'ARN mais le plus souvent dans le 3'UTR ou le 5'UTR. Les ARNm se déplacent le long des filaments d'actine ou de myosine à l'aide de protéines moteurs, comme la dynéine, afin d'arriver à l'endroit où ils seront traduits (Chin et Lécuyer 2017). Par exemple, la localisation de l'ARNm de la β -actine au bord situé à l'avant dans le sens du déplacement des cellules en migration est modulée par

la reconnaissance d'un élément de localisation bipartite par deux domaines de liaison à l'ARN ZBP1 (zipcode binding protein 1) (Farina et al. 2003).

Plusieurs maladies humaines affectent les voies de trafic d'ARN, notamment l'atrophie musculaire spinale, la maladie d'Alzheimer et le syndrome de l'X fragile montrant l'importance de la localisation des ARN (Fallini et al. 2016; Baleriola et Hengst 2015; Wei et al. 2018; Dictenberg et al. 2008).

1.1.5 Traduction

La traduction est le processus permettant de traduire l'information contenue dans les ARNm sous forme de protéine. De nombreuses étapes ainsi que de nombreux acteurs sont nécessaires. Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique de grande taille responsable de la traduction, il se fixe à l'extrémité 5' de l'ARNm et lorsqu'il identifie le codon d'initiation, il parcourt l'ARNm jusqu'au codon stop. Il permet ainsi la synthèse des protéines par liaison séquentielle de chaque acide aminé apporté par l'ARNt qui fait le lien entre les « deux mondes » acides nucléiques/acides aminés. Chaque triplet de nucléotides de l'ARNm, que l'on appelle codon, est associé à un acide aminé dans le code génétique. Le ribosome possède trois sites de liaison aux ARNt : le site A (pour Aminoacyl-ARNt) où se fixe l'aminoacyl-ARNt à son entrée dans le ribosome ; le site P (pour Peptidyl-ARNt) occupé par un aminoacyl-ARNt dont l'acide aminé est lié à la chaîne polypeptidique ; et le site E (pour Exit) où est libéré l'ARNt désacétylé par le tunnel de sortie présent dans la grande sous-unité. Le ribosome possède deux sous-unités et la masse du ribosome humain est de 4.3 MDa. Les deux sous-unités ont été nommées par rapport à leur vitesse de sédimentation : 40S et 60S. Une fois assemblées elles forment le ribosome 80S. La grande sous-unité (60S) est constituée de trois ARNr (28S, 5S et 5.8S) ainsi que de 47 protéines. Quant à elle la petite sous-unité (40S) est composée de l'ARNr 18S et de 33 protéines. L'appariement d'un codon avec son anticodon qui sont portés respectivement sur l'ARNm et l'ARNt est réalisé au niveau de la petite sous-unité. Ce dernier porte un acide aminé estérifié sur son extrémité 3' (aminoacyl-ARNt). La liaison peptidique entre les acides aminés est catalysée par le centre peptidyl transférase (PTC) situé dans la grande sous-unité du ribosome (Khatte et al. 2015).

La traduction débute par un codon d'initiation (habituellement AUG) situé en 5' de l'ARNm et se termine en 3' par l'un des trois codons stop (UAA, UAG ou UGA). La

première étape de la traduction consiste au recrutement du ribosome en 5' de l'ARNm à traduire, c'est l'initiation de la traduction.

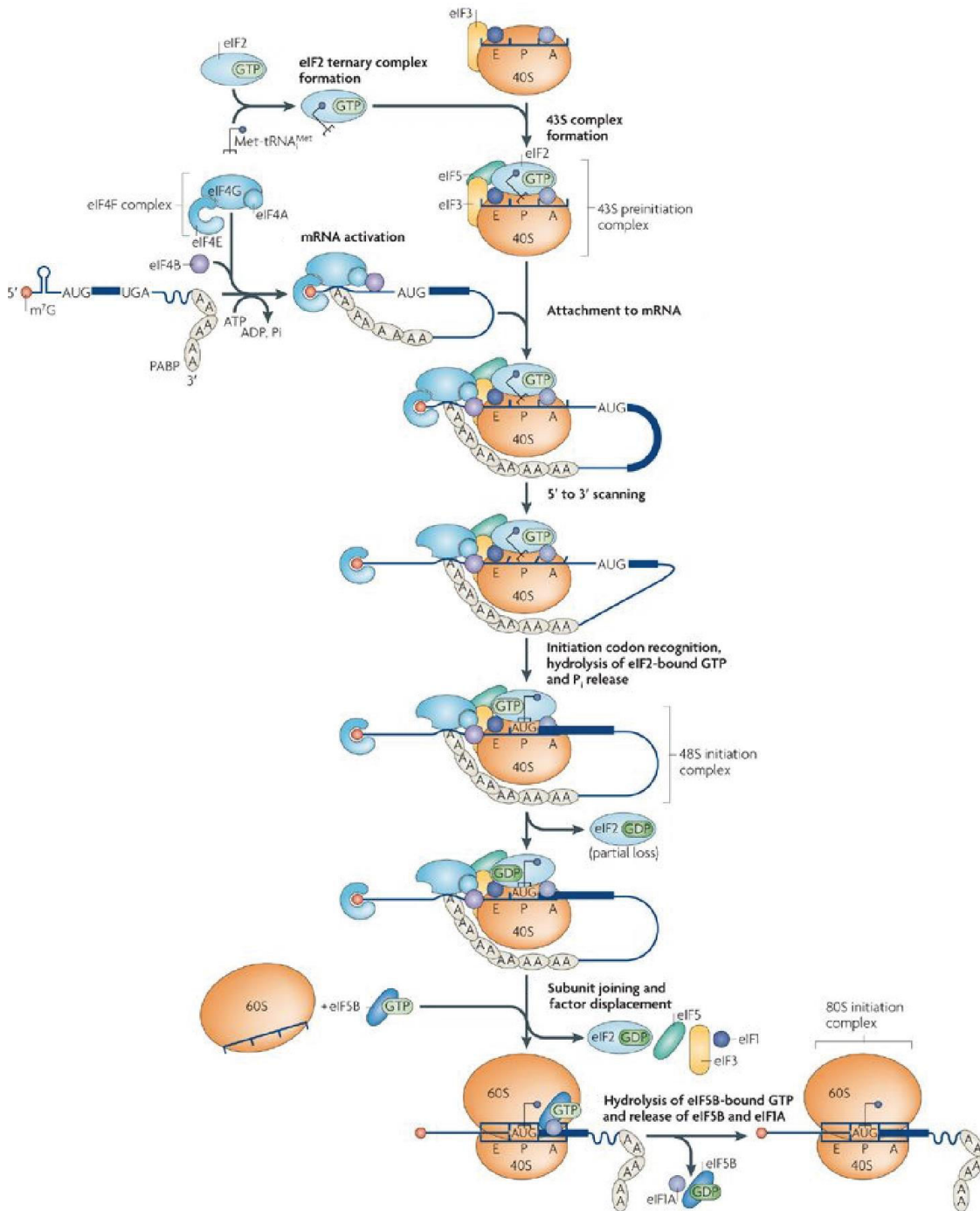


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'initiation de la traduction (Figure de Jackson, Hellen, et Pestova 2010).

1.1.5.1 Initiation de la traduction

L'initiation se déroule en plusieurs étapes permettant d'assembler les deux sous-unités ribosomiques sur l'ARNm (

Figure 6). La première étape consiste en la fixation d'un méthionyl-ARNt sur le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2) associé à du GTP, qui forme le complexe ternaire. Ce complexe va ensuite lier la petite sous-unité ribosomique ainsi que les facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et probablement eIF5, formant ainsi le complexe de pré-initiation 43S. En parallèle, les structures secondaires proches de la coiffe de l'ARNm sont déroulées par l'hélicase eIF4A qui fait partie du complexe eIF4F. Ce dernier est également composé de la protéine eIF4E qui se lie à la coiffe ainsi qu'eIF4G. Durant cette étape, appelée activation de l'ARNm, les facteurs eIF4B se fixent aussi sur l'ARNm en 5'. Le complexe 43S se lie alors à cette région de l'ARNm formant le complexe 48S puis commence à scanner le 5'UTR de 5' en 3'. Lorsque le codon d'initiation est reconnu, le complexe passe en conformation dite « fermée » ce qui entraîne le relargage d'un phosphate inorganique par le GTP de eIF2. Ensuite, la grande sous-unité rejoint le complexe en place au même moment où les facteurs eIF2-GDP, eIF1, eIF3, eIF4B, eIF4F et eIF5 sont déplacés. L'hydrolyse du GTP lié à eIF5B permet la libération d'eIF5B-GDP et eIF1A, ce qui laisse libre le ribosome 80S permettant l'entrée en phase d'élongation (Jackson, Hellen, et Pestova 2010).

1.1.5.2 Elongation de la traduction

Une fois que le ribosome 80S est positionné au niveau du codon AUG, un complexe constitué du facteur d'élongation 1A (eEF1A) associé à du GTP et à un aminoacyl-ARNt est recruté. Ce complexe est positionné de manière à ce que l'anticodon de l'ARNt soit en contact avec son codon complémentaire sur l'ARNm qui est alors situé dans le site A du ribosome (Figure 7). Cette étape est appelée l'accommodation.

Lorsque cet appariement est effectué, le GTP porté par eEF1A est hydrolysé permettant la dissociation du facteur eEF1A-GDP. Une fois que l'aminoacyl-ARNt est en place dans le site A, la prochaine étape peut avoir lieu. Il s'agit de la catalyse de la liaison peptidique entre le nouvel acide aminé présenté dans le site A et le polypeptide lié au tRNA présent dans le site P. Cette transpeptidation est réalisée par le PTC présent dans la sous-unité 60S, qui conjointement à cette catalyse, se décale sur vers l'extrémité 3' de l'ARNm. Cela a pour effet d'entraîner les deux ARNt en un état

hybride, où les extrémités aminoacylées se retrouvent dans les sites E et P au niveau de la grande sous-unité. L'arrivée d'eEF2-GTP ainsi que son hydrolyse permet à la sous-unité 40S d'avancer sur l'ARNm d'exactly trois nucléotides. Lorsque cette translocation est effectuée, le peptidyl-ARNt et l'ARNt désacétylé se retrouvent alors dans les sites E et P des deux sous-unités du ribosome. La chaîne polypeptidique en cours d'élongation sort du ribosome par le biais d'un tunnel situé dans la grande sous-unité. L'ARNt désacétylé situé dans le site E est relargué dans le cytoplasme et le site A est à nouveau libre, ce qui permet de recommencer un cycle d'élongation (Schuller et Green 2018).

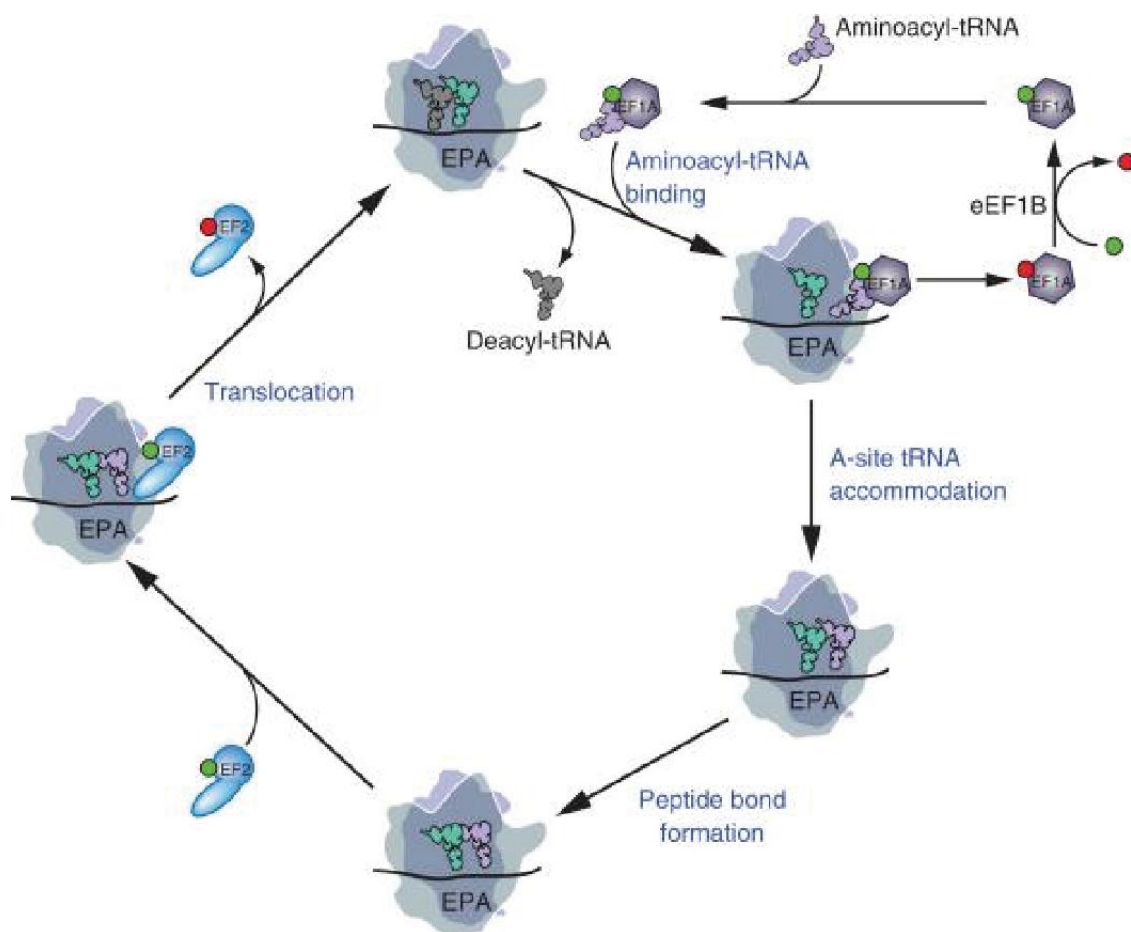


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de l'élongation de la traduction (Figure de Dever et Green 2012).

1.1.5.3 Terminaison de la traduction

Le processus de terminaison de la traduction est enclenché lorsque le ribosome rencontre l'un des trois codons stop dans son site A (Figure 8). Le complexe eRF1-eRF3-GTP s'associe alors au site A du ribosome. L'hydrolyse du GTP permet ensuite la libération d'eRF3-GDP. L'étape suivante consiste en la fixation de l'ATPase ABCE1 ce qui a pour effet de faciliter l'adaptation d'eRF1 dans une configuration active optimale au sein du ribosome. Ensuite, eRF1 hydrolyse la liaison peptidyl-ARNt entraînant le relargage du polypeptide par le tunnel qui est présent sur la grande sous-unité ribosomique (Dever et Green 2012). Ce polypeptide est alors pris en charge par des protéines chaperonnes permettant de la replier. De nombreuses RBP dont la PABP permettent de réguler la terminaison de la traduction (Ivanov et al. 2016).

ABCE1 est supposé être à l'origine de la dissociation des deux sous-unités du ribosome grâce à l'hydrolyse d'une ATP (Barthelme et al. 2011). Cette dissociation permet la réutilisation rapide des sous-unités ribosomique. Ce processus est appelé le recyclage ribosomique.

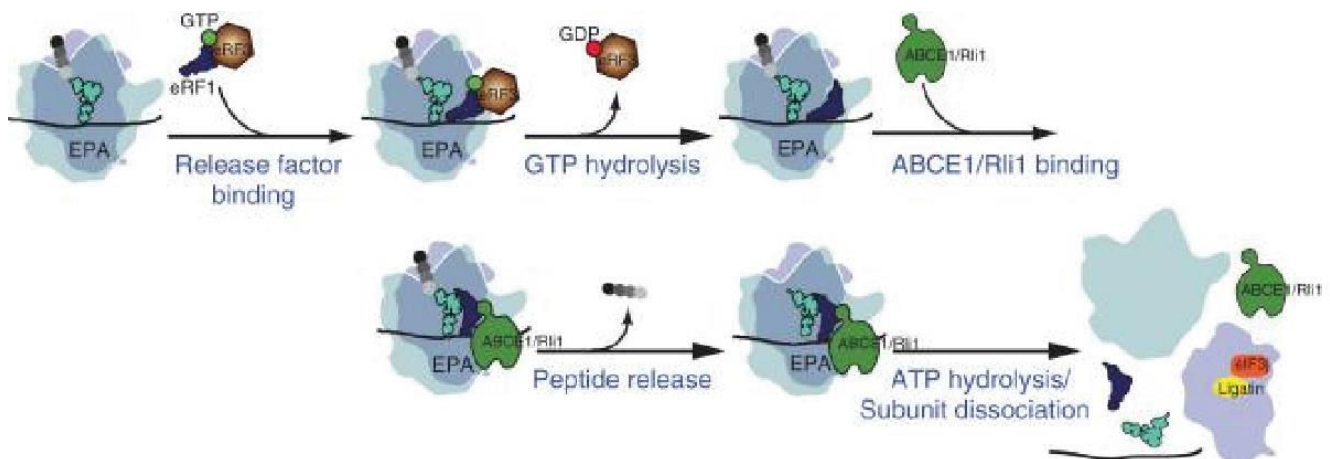


Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la terminaison de la traduction (Figure de Dever et Green 2012).

1.2 La dégradation des ARN

Des variations dans les niveaux d'ARN matures peuvent être la conséquence de modifications au cours de la transcription, maturation ou dégradation des ARN (Rabani

et al. 2014). Des erreurs pendant la transcription et la maturation peuvent aboutir à la création de transcrits qui peuvent être néfastes pour la cellule. La dégradation des ARN permet à la fois l'élimination de ces transcrits aberrants ou défectueux ainsi que la régulation de l'expression génique.

La majorité des enzymes catalytiques responsables de la dégradation des ARN sont les RNases. Ces enzymes sont présentes à toutes les étapes de la vie des ARNm ainsi que des ARN non-codants (Figure 9).

La dégradation des ARN est cruciale pour de nombreux processus biologiques comme la différenciation (Belair et al. 2019), la prolifération (Mittal et al. 2011; Towler et al. 2016), la migration (Banerjee et al. 2015), l'apoptose (Thomas et al. 2015), l'autophagie (Lu et al. 2019), l'inflammation (Koczera et al. 2016), etc...

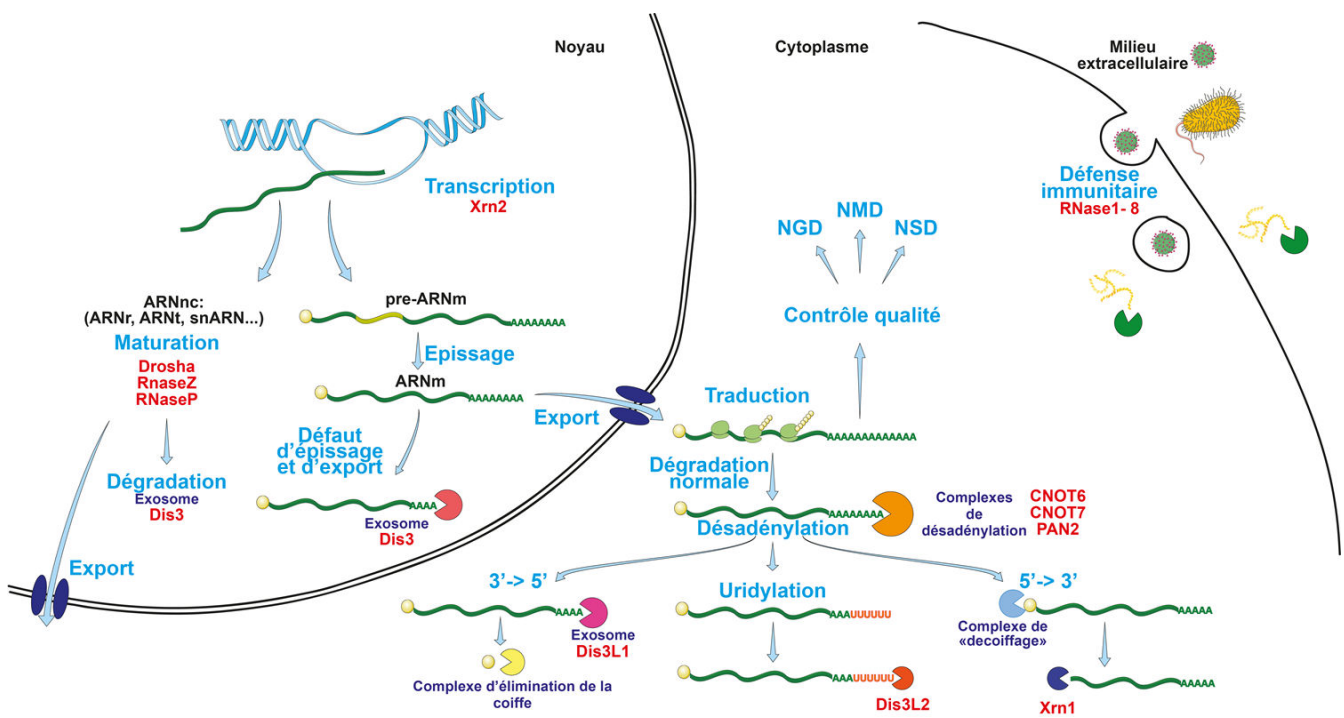


Figure 9 : Représentation des grandes étapes de la vie des ARN dans une cellule eucaryote. Les complexes majeurs impliqués dans la dégradation des ARN sont indiqués en bleu foncé. Les noms des RNases majeures impliquées dans les différents processus sont indiqués en rouge.

1.2.1 Dégradation des ARN nucléaires

La dégradation des ARN non-codants ainsi que les ARNm rencontrant des problèmes de maturation dans le noyau comme un défaut d'épissage ou d'ajout de la coiffe est réalisée essentiellement par un complexe multi-protéique appelé exosome nucléaire. Ce complexe est aussi impliqué dans la maturation des ARNr (Henras et al. 2015). Chez l'homme ce complexe est constitué d'un noyau catalytiquement inactif de neuf protéines (EXO-9) et de deux sous-unités catalytiques, EXOSC10 et EXOSC11 (aussi connues comme Rrp6 et DIS3). EXO-9 forme une structure en forme de tonneau constitué de six protéines EXOSC1 à 6 (nommés Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 et Mtr3 chez la levure) ayant des similarités avec la ribonucléase PH. Trois protéines possédant des domaines de liaison à l'ARN de type KH forment un « chapeau » nécessaire à la stabilité de ce complexe EXOSC7, 8 et 9 (Rrp4, Rrp40 et Csl4) (Q. Liu, Greimann, et Lima 2006). Les deux sous-unités catalytiques occupent les extrémités opposées d'EXO-9 pour constituer EXO-11. Rrp6 est placé au sommet du tonneau près du pore d'entrée de l'ARN et DIS3 est attaché au-dessous du tonneau près du pore de sortie de l'ARN (Figure 10). Rrp6 et DIS3 sont des exonucléases 3' – 5', mais DIS3 possède également une activité endonucléolytique (Lebreton et al. 2008) qui facilite le processus de dégradation. Rrp6 élargit le canal central du noyau EXO-9 et stimule l'activité de Dis3 (Kilchert, Wittmann, et Vasiljeva 2016). Il a été démontré que la région C-terminale de Rrp6, appelée «lasso», lie l'ARN à proximité du canal EXO-9 et améliore sa dégradation (Wasmuth et Lima 2017). Chez l'homme, Rrp6 et DIS3 sont essentiellement nucléaires, mais Rrp6 présente un enrichissement nucléolaire important, alors que DIS3 est exclu des nucléoles. On note cependant que l'exosome avec DIS3 est présent en quantité plus faible dans le cytoplasme.

Chez l'Homme un dysfonctionnement de DIS3 provoque l'accumulation de produits de la transcription pervasive comme les PROMPTs (Szczepińska et al. 2015). Une forte proportion de produits de terminaison de la Pol II prématurés a été détectée dans les cellules DIS3 mutantes. De plus, les mutations DIS3 ont entraîné une mauvaise régulation de l'expression d'environ 50% des gènes codant pour les protéines transcrites, probablement en tant qu'effet secondaire de l'accumulation de diverses espèces d'ARN non codantes. Cette analyse a aussi mis en évidence que DIS3 est la principale enzyme de maturation des snoARN (Szczepińska et al. 2015).

Chez la drosophile, le gène orthologue de DIS3 est exprimé différemment durant le développement et est un acteur majeur pour la régulation du transcriptome durant le développement de l'embryon (Hou, Ruiz, et Andrulis 2012).

L'exosome possède plusieurs cofacteurs dont font partie Mtr4, Rrp47 et Mpp6, qui sont nécessaires pour une activité maximale de l'exosome nucléaire. L'interaction Rrp47-Rrp6 fournit une plateforme de liaison à Mtr4, une hélicase à ARN essentielle (Schuch et al. 2014). Mpp6 se lie à la sous-unité du « chapeau » Rrp40 et améliore l'activité de l'hélicase Mtr4. Cette activité est nécessaire pour ouvrir les structures secondaires formées à l'extrémité 3' des substrats, afin que les ARN monocaténaire résultants puissent passer dans le canal central du tonneau avec leur extrémité 3' en premier (Ogami, Chen, et Manley 2018).

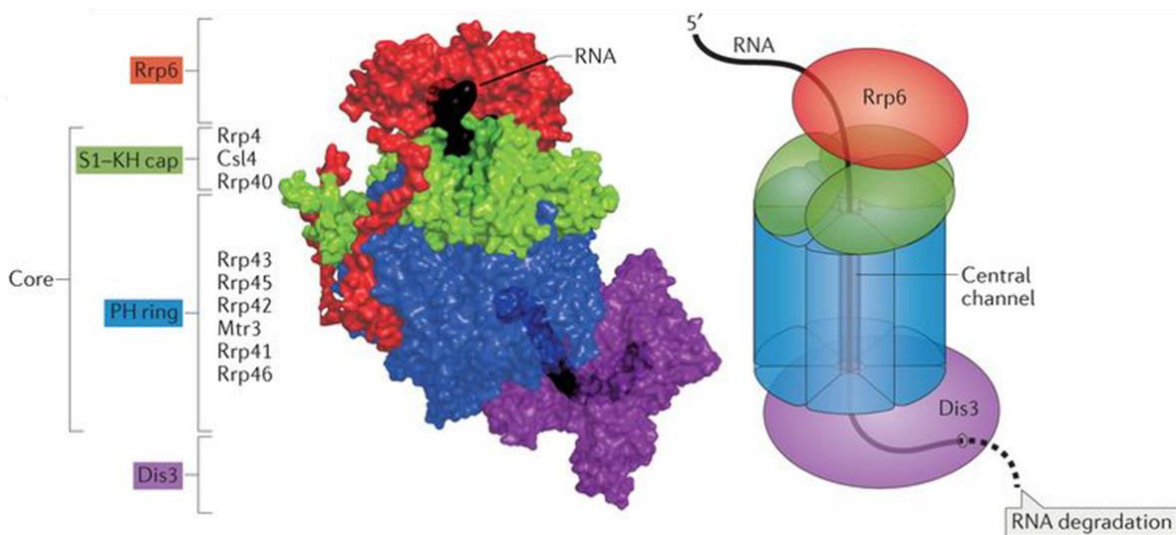


Figure 10 : Organisation de l'exosome nucléaire de levure. A gauche: un modèle du complexe exosome EXO11. Au centre: la structure de surface correspondante. Rrp6 est représenté en rouge, le « chapeau » en vert; EXO-6 en forme de tonneau en bleu, Dis3 en violet et l'ARN en noir. A droite: schéma d'une molécule d'ARN filant de 3' à 5' à travers le canal central vers Dis3, où il est dégradé. (Kilchert, Wittmann, et Vasiljeva 2016)

Dans le nucléole, l'hélicase Mtr4, la protéine doigt de zinc ZCCHC7 et la polymérase poly(A) non-canonique PAPD5 forment le complexe TRAMP. PAPD5 est responsable de la polyadénylation d'ARN nucléolaires, tels que les snoARN (petits ARN

nucléolaires) ou les pré-ARNr aberrants, en accord avec le fait que la polyadénylation par le complexe TRAMP facilite la dégradation de l'ARN de 3' en 5'.

Dans le nucléoplasme, deux adaptateurs de l'exosome sont connus. Le premier est le complexe Mtr4-ZFC3H1 appelé complexe de ciblage de queue poly(A) (PAXT). Il permet à l'exosome de cibler divers types de longs ARN non-codants. Le second complexe est appelé le complexe de ciblage de l'exosome nucléaire (NEXT), qui est composé de Mtr4, de la protéine de liaison à l'ARN RBM7 et la protéine ZCCHC8. Ce complexe permet la dégradation d'ARNm d'histones, de petits ARN nucléaires (snARN) et de snoARN. Les principes moléculaires précis de la reconnaissance des substrats par ces complexes ne sont pas bien compris (Ogami, Chen, et Manley 2018). Il a été démontré que PABPN1 favorise la dégradation des transcrits nucléaires poly(A) dépendants de l'exosome (Ogami, Chen, et Manley 2018).

Des interactions entre des cofacteurs de l'exosome et le spliceosome ont été décrites, suggérant que l'épissage et le contrôle qualité sont étroitement liés (N. N. Lee et al. 2013). Chez la levure et l'homme, il a été montré que des rétentions d'introns entraînent une dégradation du pré-ARNm par l'exosome dans le noyau ou le cytoplasme (Yap et al. 2012; Braunschweig et al. 2014).

Des fonctions annexes de l'exosome nucléaire dans la réparation de dommages à l'ADN et dans la commutation de classe des anticorps dans les lymphocytes ont été suggérées mais nécessitent plus d'études afin d'en comprendre les mécanismes (Kilchert, Wittmann, et Vasiljeva 2016).

En plus de son rôle dans la terminaison de la transcription, l'exonucléase 5'-3' Xrn2 semble aussi jouer un rôle dans la dégradation nucléaire d'ARNm et dans la maturation des ARNr (Nagarajan et al. 2013).

1.2.2 Dégradation des ARNm cytoplasmiques

Comme indiqué ci-dessus, la régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes se produit à plusieurs niveaux.

Dans cette partie seront décrits les mécanismes de dégradation des ARNm fonctionnels suivi des voies de dégradation relevant du contrôle qualité des ARNm. Généralement, la dégradation des ARNm est initiée par la déprotection du transcrit, ce

qui nécessite une modification des extrémités de l'ARNm. Pour la majorité des ARNm, le raccourcissement de la queue de poly(A), appelée : désadénylation, est un événement signalant que l'ARNm doit être dégradé. Une queue poly(A) raccourcie sert de plateforme d'atterrissage pour le complexe Lsm1–7/Pat1, qui recrute l'enzyme de clivage de la coiffe stimulant l'élimination de cette dernière. Ce qui permet la dégradation du corps de l'ARN par Xrn1 dans la direction 5'-3'. Alternativement, une queue poly(A) raccourcie permet à l'exosome de dégrader l'ARN dans le sens inverse (Łabno, Tomecki, et Dziembowski 2016).

1.2.2.1 Désadénylation

La désadénylation a longtemps été considérée comme l'étape limitante du processus de dégradation de l'ARNm, essentielle pour l'activation de la dégradation de l'ARNm cytoplasmique dans les deux directions 5'-3' et 3'-5'.

La régulation de la longueur de la queue poly(A) est un processus où des poly(A) polymérase (PAP) canoniques PAP α , β et γ et des exonucléases spécifiques appelées désadénylases, synthétisent ou raccourcissent la queue poly(A) permettant un contrôle précis de la stabilité de l'ARNm. Plusieurs enzymes distinctes sont capables de dégrader les queues poly(A), agissant à différentes phases de la réaction. Chez l'Homme, l'activité de la désadénylation cytoplasmique provient principalement des complexes Ccr4-Not et Pan2-Pan3 (Wahle et Winkler 2013).

Le complexe CCR4-NOT (Carbon Catabolite Repression 4 - Negative On TATA-less) est la désadénylase majeure. Chez l'Homme il est constitué de la protéine d'échafaudage CNOT1 (CCR4-NOT transcription complex subunit 1), des protéines CNOT2, CNOT3, CNOT6/6L, CNOT7/8, CNOT9, CNOT10, CNOT11 (Figure 11). Deux sous-unités de ce complexe exercent une activité catalytique, à savoir les orthologues mutuellement exclusifs de CCR4 : CNOT6 et CNOT6L et les orthologues mutuellement exclusifs de CAF1 : CNOT7 et CNOT8. Ce sont des exoribonucléases poly(A) spécifiques 3'-5'. CNOT6/6L doit son activité à un domaine de type EEP (endonucléase-exonucléase-phosphatase). CNOT7/8 possède un domaine RNase DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp). Chez les mammifères, CNOT4, qui possède une activité E3 ubiquitine-ligase, n'est pas associée de manière stable au complexe (Lau et al. 2009; Mauxion, Prève, et Séraphin 2013).

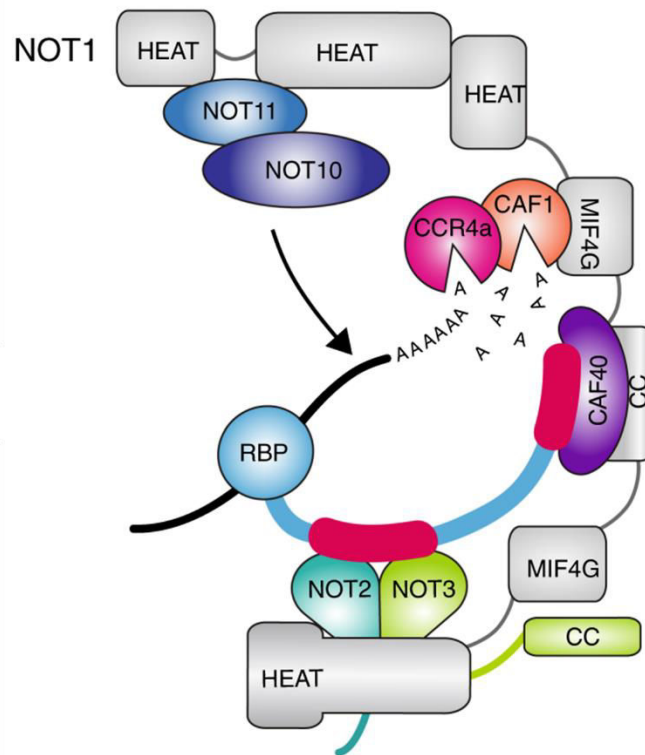


Figure 11 : Modèle de désadénylation par le complexe CCR4-NOT humain après recrutement par une protéine liant l'ARN (RBP) (Raisch et al. 2019)

Comme mentionné précédemment, le complexe Pan2-Pan3 possède également une activité de désadénylation. Chez l'Homme, il est composé de deux protéines : PAN2 / PAN3. PAN2 est la sous-unité catalytique de ce complexe et appartient à la famille des exoribonucléases DEDD. Cette nucléase montre une préférence pour le substrat poly(A) et est stimulée par les PABP en recrutant le complexe sur la queue poly(A). PAN3 humain intervient dans le recrutement de PAN2 dans l'ARNm par le biais de PABP (Wahle et Winkler 2013).

Récemment il a été démontré que la désadénylation est initiée par le complexe PAN2-PAN3 qui interagit avec deux ou plus PABP, puis que le complexe CCR4-NOT permet d'achever le processus (Schäfer et al. 2019).

D'autres désadénylases ont été identifiées comme PARN, Angel et Nocturnin, ce qui élargit encore le répertoire des régulateurs de longueur de queue poly(A) chez les eucaryotes. Contrairement aux désadénylases décrites ci-dessus, ces enzymes ne semblent pas agir au sein de complexes multi-protéiques (Godwin et al. 2013).

PARN appartient à la famille des nucléases DEDD et est présent dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau. PARN agit comme un homodimère. Chez les mammifères,

dans le cytoplasme, cette protéine agit pendant le processus de contrôle qualité appelé NMD décrit plus tard (Lejeune, Li, et Maquat 2003). Il a aussi été proposé que PARN est active à la fois dans le noyau, où elle jouerait un rôle dans la maturation de l'extrémité 3' des snoARN (Berndt et al. 2012) ainsi que dans la dégradation des transcrits suite à un dommage à l'ADN (Cevher et al. 2010).

La protéine Nocturnin/NOC est un homologue distant de CNOT6/6L régulée par le cycle circadien (R. Li et al. 2008). Elle appartient à la superfamille EEP avec un domaine catalytique conservé. Un rôle dans la régulation des rythmes circadiens, dans les réponses inflammatoires et le métabolisme des nutriments ont été proposés (Green et al. 2007). La protéine recombinante GST-Nocturnin produite chez *E. coli* puis purifiée a montré une activité désadénylase *in vitro* (Green et al. 2007). L'expression de cette protéine peut induire une réponse intense à un choc en sérum, la présence de phorbol ester ou de lipopolysaccharides (LPS). De plus, des souris mutantes NOC^{-/-}, possèdent une résistance à l'obésité après administration d'un régime riche en graisse (HFD). Ceci est dû à un défaut de transit des lipides dans les entérocytes intestinaux, aboutissant à une absorption inefficace dans le sang (Green et al. 2007). Chez la souris, NOC joue également un rôle dans la stabilité de transcrits liés à l'activité mitochondriale justifiant en partie le phénotype métabolique des souris NOC^{-/-} (Kojima et al. 2015). Cependant 2 études ont montré que la protéine NOC purifiée ne possède pas d'activité désadénylase (Estrella, Du et Korennykh 2018; Abshire et al. 2018). Il a ensuite été démontré récemment que les substrats de cette protéine sont NADP⁺ et NADPH (Estrella et al. 2019). Ce dernier résultat suggère que la désadénylation liée à cette protéine observée par Green et ses collègues (Green et al. 2007) était soit un artefact, soit due à une contamination dans l'extrait de protéine purifiée.

Très peu de données sont disponibles sur la désadénylase Angel (Wagner, Clement, et Lykke-Andersen 2007).

L'étape de désadénylation est fortement régulée car elle est limitante pour le processus de dégradation des ARNm afin de réguler la demi-vie des ARNm en fonction des conditions. Ces régulations sont dues à la présence de séquences généralement situées dans la région 3' UTR des ARN, reconnues par des protéines RBP spécifiques ou des micro-ARN.

Chez les mammifères, des séquences riches en adénosines et en uridines, nommées AU-Rich Elements (ARE), dans les ARNm ayant une demi-vie courte. Ces séquences sont capables recruter des ARE-BP (ARE-Binding Proteins), qui soit stabilisent les transcrits, soit favorisent leur dégradation. Par exemple, la protéine tristétraproline (TTP), en se fixant sur la région ARE d'un ARN, peut recruter le complexe CCR4-NOT entraînant la désadénylation du transcrit puis sa dégradation (W. S. Lai, Carrick, et Blackshear 2005). Son rôle le plus étudié est celui qu'elle joue dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α). En fonction de l'activité de la MAP kinase p38, le transcrit est soit dégradé soit traduit et stabilisé (Brooks et Blackshear 2013). Lorsque l'activité de p38 diminue, la réserve de TTP inactif est déphosphorylé et devient actif, déstabilisant les ARNm cibles (O'Neil, Ammit, et Clark 2018). Elle interagit aussi avec d'autres protéines dont Dcp1/2, Upf1 ou Xrn1.

La famille de protéines BTG/Tob est aussi capable de réguler la désadénylation. Cette famille est constituée de 6 membres chez les vertébrés, BTG1, BTG2, BTG3, BTG4, Tob1 et Tob2. Ces protéines se caractérisent par la présence d'un domaine APRO (Anti-PROliferative) N-terminal contenant deux motifs conservés, boxA et boxB (Mauxion et al. 2009). Elles sont capables de lier à la fois les PABP et les orthologues de la désadénylase CAF1, induisant la désadénylation par le complexe CCR4-NOT par rapprochement de ce complexe de la queue poly(A) (Ruan et al. 2010; Y. Liu et al. 2016; Stupfler et al. 2016).

L'intervention du complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) par l'intermédiaire des micro-ARN est un autre moyen de régulation de la désadénylation. Les micro-ARN sont des petits ARN (20-24 nucléotides), produits à partir de structures tiges-boucles présentes au sein de pri-miARN, maturés dans le noyau par DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8) qui recrute l'activité RNase III de DROSHA. Ces structures subissent une autre maturation dans le cytoplasme par l'enzyme DICER, possédant une activité hélicase et une activité RNase, aboutissant à la production d'un ARN double brin. Ce dernier interagit ensuite avec une protéine de la famille ArGOnaute (AGO) formant le coeur du complexe RISC, contenant un micro-ARN simple brin. Ces micro-ARN sont alors disposés par complémentarité sur leur ARNm cible par les protéines AGO. Ceci entraîne soit le clivage de l'ARNm par l'activité endonucléase de la protéine AGO2, soit la répression de la traduction suivie généralement de la désadénylation et la dégradation grâce au recrutement des complexes désadénylase

PAN2-PAN3 et CCR4-NOT et du complexe d'hydrolyse de la coiffe DCP1-DCP2 (Isabelle Behm-Ansmant et al. 2006; I. Behm-Ansmant, Rehwinkel, et Izaurralde 2006; C.-Y. A. Chen et Shyu 2013).

Lorsque la queue poly(A) est raccourcie à une dizaine de nucléotides, la coiffe du transcrit peut alors être hydrolysée pour être dégradé de 5' en 3' (Lim et al. 2014) (décrit en 1.2.2.3). Alternativement, un transcrit contenant une queue poly(A) résiduelle peut être dégradé de 3' en 5' soit par l'exosome cytoplasmique soit par la DIS3L2 après uridylation par les TUTases (Lim et al. 2014) (décrit en 1.2.2.2.2).

1.2.2.2 Dégradation dans le sens 3'-5'

1.2.2.2.1 Dégradation par l'exosome

La désadénylation conduit à la libération de PABP de l'extrémité 3' de l'ARNm, permettant une attaque directe par les exoribonucléases 3'-5'. Le complexe majeur de dégradation à partir de l'extrémité 3' est l'exosome cytoplasmique. Comme discuté ci-dessous, l'exosome est crucial dans le NSD et contribue également aux voies de contrôle de la qualité NGD et NMD.

Le cœur de l'exosome cytoplasmique est le même que l'exosome nucléaire décrit ci-dessus (EXO9). L'activité catalytique de l'exosome cytoplasmique est portée par l'exonucléase DIS3L1.

In vivo, l'exosome nécessite la présence d'activateurs spécifiques, tels que le complexe Ski. Ce complexe forme un hétéro-tétramère composé de l'hélicase ATP-dépendante SKIV2L, de TTC37 et de deux copies de la protéine WDR61.

Il a été démontré que, dans les cellules humaines, des isoformes alternativement épissées de HBS1L sont responsable de la connexion des complexes exosome et Ski lors de la dégradation des ARNm (HBS1LV3) (Kalisiak et al. 2017, 1; Kowalinski et al. 2016), et la deuxième isoforme pouvant éventuellement fonctionner dans les voies de contrôle de la qualité de la traduction (HBS1LV1) (Łabno, Tomecki, et Dziembowski 2016; Zinder et Lima 2017).

1.2.2.2.2 Uridylation et dégradation par Dis3L2

Au cours des dernières années, il est devenu évident que non seulement la désadénylation, mais également l'extension des extrémités 3' des transcrits d'ARNm

avec des résidus d'uridine, c'est-à-dire l'uridylation, peut servir de signal initial déclenchant la dégradation de ce transcrit.

Les protéines TUTase-4 et TUTase-7, qui sont des nucléotidyltransférases non canoniques ont été identifiées comme des enzymes responsables de l'uridylation des extrémités 3' de l'ARNm dans les cellules humaines. Les extensions riches en U ont été ajoutées par les TUTase-4 et 7 plus efficacement aux queues de poly(A) raccourcies. Il a donc été conclu que, dans les cellules humaines, une désadénylation partielle de l'ARNm précède l'uridylation. De plus, il a été démontré que les TUTase-4 et 7 humaine étaient capables de mesurer la longueur des queues de poly(A). De plus, les protéines de liaison du poly(A) inhibent les activités d'uridylation de ces TUTases. Ceci explique pourquoi le poly(A) plus long des ARNm humains sont rarement oligouridylés (Lim et al. 2014).

D'autre part, l'exoribonucléase DIS3L2 dégradant préférentiellement les oligos U, a été découverte il y a quelques années dans les cellules humaines. La protéine DIS3L2 est localisée dans le cytoplasme mais elle n'interagit pas avec l'exosome. L'activité exonucléasique de DIS3L2 a été démontrée pour la première fois en 2012 (Astuti et al. 2012). DIS3L2 est un paralogue des sous-unités catalytiques de l'exosome DIS3 et DIS3L1. Elle dégrade de manière préférentielle les 3'-uridylés en ARNm de 3' en 5' (Lubas et al. 2013; Malecki et al. 2013). En effet une accumulation d'intermédiaires de dégradation d'ARNm uridylés et d'ARNm poly(A) et uridylés a été observée lorsque DIS3L2 a été mutée (Malecki et al. 2013; H.-M. Chang et al. 2013). Ainsi, il a été proposé que DIS3L2 soit l'acteur central de la nouvelle voie de dégradation de l'ARNm indépendante de l'exosome dans le cytoplasme. Outre l'identification de cette voie de dégradation comme parallèle à la dégradation cytoplasmique des ARNm par l'exosome, ces études ont également permis de déterminer que l'uridylation pouvait affecter le devenir de l'ARNm de deux manières différentes, potentiellement redondantes. En plus de l'activation de l'hydrolyse de la coiffe et de la dégradation de 5' en 3', l'uridylation stimule aussi la dégradation de l'ARNm dans l'autre sens en renforçant l'activité de l'exoribonucléase DIS3L2.

Dans les cellules de mammifères, DIS3L2 a été impliqué dans la dégradation induite par les AU-rich element (ARE), ainsi que dans la dégradation des ARNm et dans la dégradation de certains d'ARNnc (Łabno et al. 2016; Pirouz et al. 2016; Ustianenko et al. 2016).

Un lien entre l'uridylation de l'ARNm et la stimulation de l'activité de DIS3L2 *in vivo* chez les eucaryotes supérieurs a été démontré par l'identification d'une voie de dégradation de l'ARNm apoptotique dans les cellules humaines. En effet, lors de l'apoptose les TUTases 4 et 7 uridylient les ARN qui sont ensuite dégradés par Dis3L2 (Thomas et al. 2015).

Il a été démontré que la répression de l'expression de DIS3L2 avec de petits ARN interférants a entraîné une augmentation de la longueur des extensions d'uridine 3'-terminales, une inhibition de la dégradation des ARNm et une suppression de la mort cellulaire. Inversement, la surexpression de DIS3L2 améliorait l'apoptose. Ces résultats ont montré que DIS3L2 est un acteur important dans la voie de la dégradation apoptotique de l'ARNm.

Cette enzyme est aussi connue pour dégrader le pre-miARN pre-let-7 lorsque la protéine de liaison à l'ARN lin28 a fixé ce miARN et a induit son uridylation grâce au recrutement des TUTases 4 et 7. Certains miARN matures uridylysés par la TUT1 peuvent également être la cible de DIS3L2 qui est recruté par Argonaute 2 (Luan et al. 2019). Il a été montré qu'il existe une voie de contrôle de qualité Dis3L2 et TUTase-dépendante permettant la dégradation de nombreux ARNnc aberrants comme les snARN U1 et U2, l'ARNr 5s, plusieurs snoARN, etc...(Pirouz et al. 2016).

Très récemment, une étude a mis évidence le rôle de Dis3L2 dans la voie de contrôle de qualité NMD. Le devenir de douze ARNm connus pour être des cibles naturelles du NMD a été étudié en présence et en absence de Dis3L2. Une accumulation de sept de ces ARNm a été observée en absence de Dis3L2 suggérant que cette enzyme joue un rôle dans le NMD. Il a été démontré que Dis3L2 dégrade directement certaines cibles du NMD de manière UPF1-dépendante et uridylation-dépendante (da Costa et al. 2019).

1.2.2.3 Dégradation dans le sens 5'-3'

Un ARNm désadénylé, au lieu d'être directement dégradé par la voie 3'-5', peut subir une hydrolyse de la coiffe. L'enzyme responsable de cette étape est la protéine Dcp2, qui catalyse l'hydrolyse de la structure de la coiffe (van Dijk et al. 2002).

Chez la levure, il a été montré que Dcp2 et Xrn1 sont recrutées séquentiellement sur l'ARNm par interaction avec Pat1 (Figure 12A) (Charenton et al. 2017)

Dcp2 requiert des cofacteurs, connus sous le nom de stimulateur d'hydrolyse de la coiffe (EDC) pour stimuler son activité. Dans les cellules humaines, la liaison avec Dcp1 est nécessaire (C.-T. Chang et al. 2014). Cependant, l'interaction entre Dcp1 et Dcp2 dans les cellules humaines est très faible, EDC4 est nécessaire pour sa stabilisation (Figure 12B).

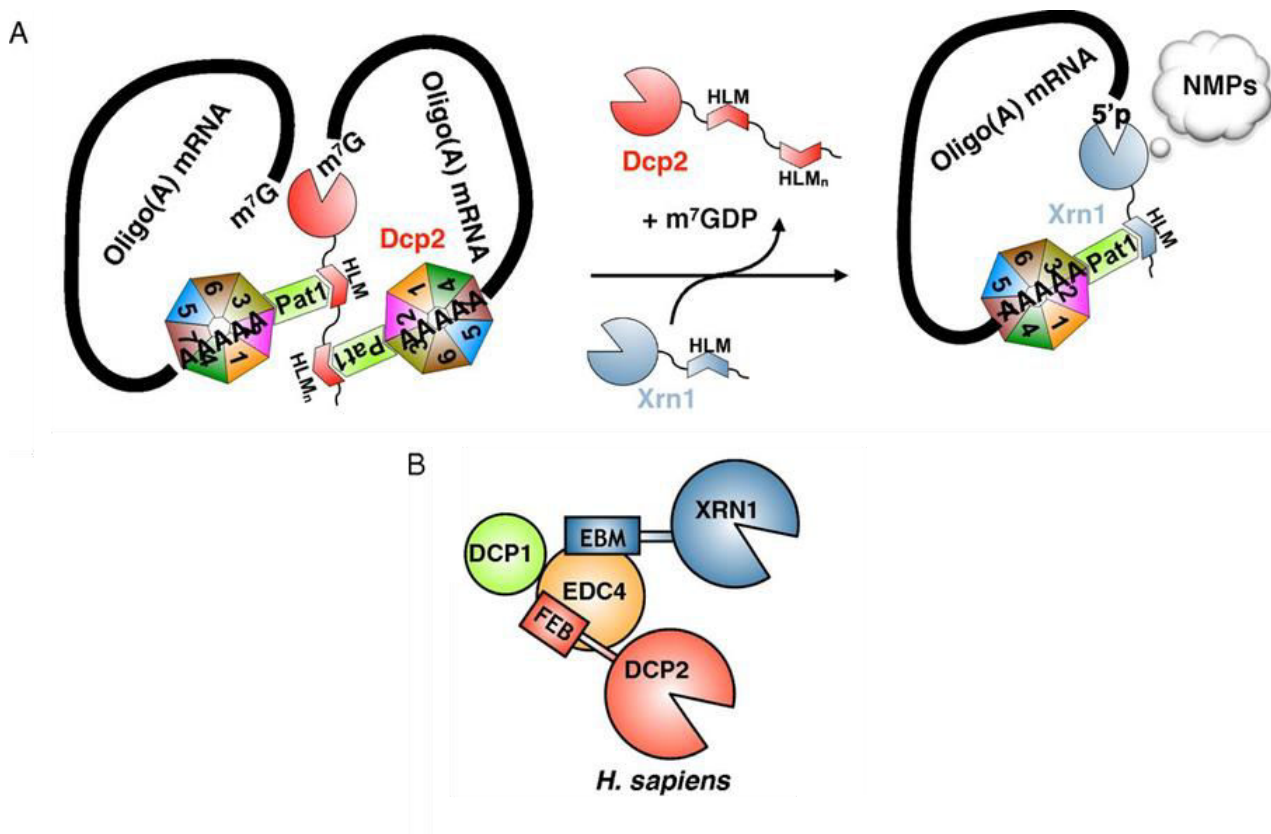


Figure 12 : Comparaison des mécanismes de recrutement de Dcp2 et Xrn1 sur des ARNm eucaryotes désadénylés. (A) Modèle pour le 5'-3' coordonné par Pat1. Mécanisme de dégradation de l'ARNm chez la levure. (B) Modèle du complexe d'hydrolyse de la coiffe chez l'homme. EBM, motif de liaison à EDC4; FEB, motif de liaison à EDC4 riche en phénylalanine; NMP, nucléoside monophosphate (D'après Charenton et al. 2017)

Chez la levure, il a été démontré que Edc1 stabilise Dcp2 dans sa forme active (Mugridge et al. 2018). Toujours chez la levure, une étude structurale a démontré qu'Edc3 ne lie pas la coiffe mais que la liaison d'Edc3 à la protéine Dcp2 entraîne la

formation d'une longue hélice et d'une surface étendue chargée positivement (Charenton et al. 2016). Ceci peut contribuer à l'amélioration de l'affinité pour l'ARN et donc à la stimulation de l'activité catalytique Dcp2.

Il existe plusieurs activateurs de l'élimination de la coiffe comme la protéine PAT1 qui inhibe la traduction ou le complexe LSM1-7, se fixant en 5' sur la queue poly(A) raccourcie. Il est constitué de 7 protéines formant une structure en forme d'anneau qui protège les transcrits contre des activités exonucléases 3'-5' mais active l'hydrolyse de la coiffe.

L'enzyme responsable de la dégradation de 5' en 3' est XRN1. Elle interagit avec le complexe d'hydrolyse de la coiffe par l'intermédiaire d'EDC4 (C.-T. Chang et al. 2014) et est directement recrutée pour dégrader les ARNm dépourvu de coiffe de 5' en 3', constituant une voie prédominante responsable de la dégradation des ARNm. Récemment, il a été montré que XRN1 interagit directement avec EDC4 via un motif à son extrémité C-terminale, ce qui permet d'établir un lien direct entre l'hydrolyse de la coiffe et la dégradation 5'-3' de l'ARNm. XRN1 peut également interagir directement avec le complexe CCR4-NOT via une région de faible complexité situé en C-terminal et ainsi bloquer la désadénylation de l'ARNm dépendant de CAF1. La protéine PatL1 entre en compétition avec CCR4 – NOT pour se lier à XRN1 et lève l'inhibition médiée de l'activité catalytique de CCR4 – NOT *in vitro* (C.-T. Chang et al. 2019).

Bien que Dcp2 est l'enzyme d'hydrolyse de la coiffe majoritaire, d'autres protéines de la famille Nudix comme Nudt3 et Nudt16 possèdent la même activité (Grudzien-Nogalska et Kiledjian 2017).

1.2.2.4 Elimination du résidu de coiffe

Après la dégradation 3'-5' effectuée par l'exosome, le fragment d'ARNm restant avec sa coiffe 5' (m7GpppN) est dégradé par l'enzyme éliminatrice de coiffe DCPS. DCPS est capable d'hydrolyser efficacement un substrat d'ARN coiffé lorsque sa longueur n'excède pas 10 nt (Milac, Bojarska, et Wypijewska del Nogal 2014).

De plus, outre la dégradation d'un fragment d'ARNm après la dégradation 3'-5', un rôle du DCPS dans l'élimination du produit de dégradation final 5'-3' (m7GDP) a été montré.

Dans la même étude, une nouvelle enzyme avec une activité d'élimination de la coiffe, appelée FHIT chez l'homme a été décrite (Taverniti et Séraphin 2015).

1.2.3 Contrôle qualité

Trois processus de contrôle de la qualité existent pour éliminer les transcrits non fonctionnels et les protéines aberrantes. Des ARNm aberrants peuvent être produits à la suite de nombreux processus comme une maturation incorrecte de l'ARN, une mutation somatique, une mutation dans la lignée germinale, une erreur lors de la transcription ou de l'épissage.

Dans le cytoplasme, il existe des mécanismes de contrôle de la qualité de la traduction associés au ribosome, qui dégradent les ARNm défectueux et les produits protéiques aberrants (Brandman et Hegde 2016). Les mécanismes de contrôle de la qualité co-traductionnels affectent le devenir des peptides naissants, en éliminant les protéines mal repliées (Lykke-Andersen et Bennett 2014).

Les mécanismes principaux de contrôle qualité dans le cytoplasme sont le NGD (No-Go mRNA Decay), le NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay) et le NSD (Non-Stop mRNA Decay).

1.2.3.1 NGD

Le No-Go Decay permet la dégradation de transcrits associés à un ribosome bloqué durant la phase d'élongation de la traduction. Le blocage peut être causé par des structures secondaires d'ARN stables comme des structures tige-boucle, par la dépurination de l'ARNm, par la présence de nombreux codons rares, ou la synthèse d'une poly-lysine (par exemple due à la traduction de la queue poly(A)) ou poly-arginine qui se bloque dans le tunnel de sortie du ribosome du fait de leur charge (Doma et Parker 2006; Gandhi, Manzoor, et Hudak 2008). La structure d'un ribosome de levure bloqué a été résolue par cryo-EM, montrant la liaison de Dom34 au site A (Becker et al. 2011). Après fixation de Dom34-Hbs1, une endonucléase, qui a récemment été identifiée comme étant Cue2 chez la levure, est recruté (D'Orazio et al. 2019). Il est suggéré que son homologue chez les mammifères (N4BP2) joue le même rôle et que cela conduit à la dissociation des ribosomes bloqués à l'aide de l'ATPase ABCE1 (D'Orazio et al. 2019). L'ARNm qui est clivé est dégradé par

l'exoribonucléase XRN1 et l'exosome (Doma et Parker 2006; Shoemaker et Green 2012).

Les polypeptides naissants sont polyubiquitinylés par la protéine Listerin permettant leur dégradation rapide (Brandman et Hegde 2016).

Cependant, il est important de noter qu'aucune preuve de la présence de NGD chez l'Homme n'a été démontrée.

1.2.3.2 NSD

L'une des autres voies de contrôle qualité des ARNm est le Non-Stop Decay. Cette voie de dégradation est mise en place par la cellule lorsqu'un transcrit ne possède aucun codon stop dans le bon cadre de lecture. Ceci est possible par exemple lorsqu'une erreur de maturation engendre une polyadénylation précoce dans une séquence codante. De nombreuses études sur ce mécanisme ont été réalisées chez la levure. Ceci a permis d'identifier la GTPase appelée Ski7 comme étant requise pour la dégradation des cibles du NSD.

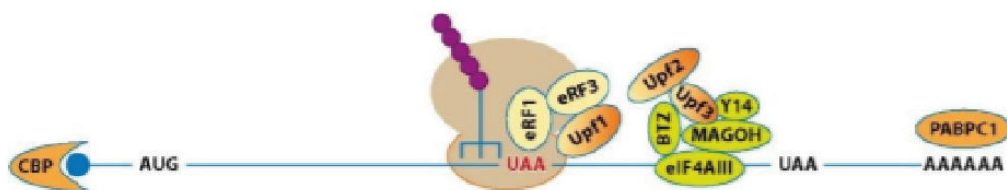
Les transcrits non-stop sont dégradés de manière co-translationnelle. Chez les mammifères, ce mécanisme requiert HBS1LV1, Pelota, les membres du complexe Ski ainsi que de l'exosome (Saito, Hosoda, et Hoshino 2013). Il a aussi été montré que l'ATPase responsable du recyclage des ribosomes, ABCE1 participe à la dissociation des ribosomes bloqués lors de la traduction dans le NSD comme dans le NGD (Pisareva et al. 2011).

Comme pour le NGD, les polypeptides naissants sont polyubiquitinylés puis dégradés.

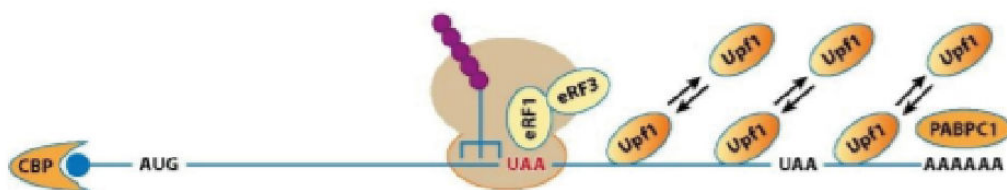
1.2.3.3 NMD

La troisième grande voie de contrôle qualité des ARNm est appelée NMD (nonsense-mediated decay). Elle cible spécifiquement les ARNm qui possèdent un codon stop précoce. Il est donc nécessaire de distinguer les ribosomes qui sont arrêtés sur un codon stop normal situé à la fin d'une phase de lecture d'un codon stop précoce. Il existe plusieurs modèles expliquant le déroulement des événements de l'arrêt du ribosome au niveau d'un codon stop précoce jusqu'à la dégradation de l'ARNm.

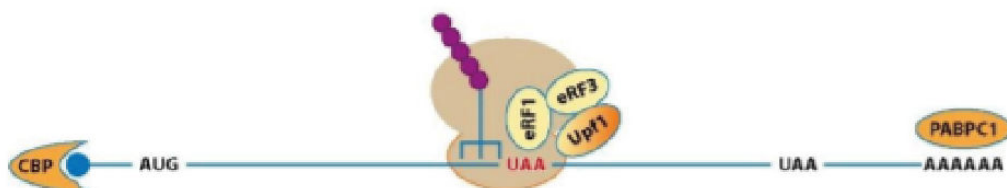
- A** UPF1 est recruté aux ARNm cibles au travers de son interaction avec eRF1 et eRF3 .
UPF1 est ensuite activée grâce à l'interaction avec les le complexe EJC présent en aval.



- B** UPF1 se lie à la région 3' des ARNm cibles, un équilibre de liaison s'établit.



- C** La terminaison précoce de la traduction ne présente pas les caractéristiques normales de terminaison ce qui conduit au recrutement d'UPF1



- D** UPF1 se lie au ribosome pendant l'élongation par un équilibre de liaison/dissociation.
En cas de terminaison précoce, elle est activée par UPF2 et UPF3

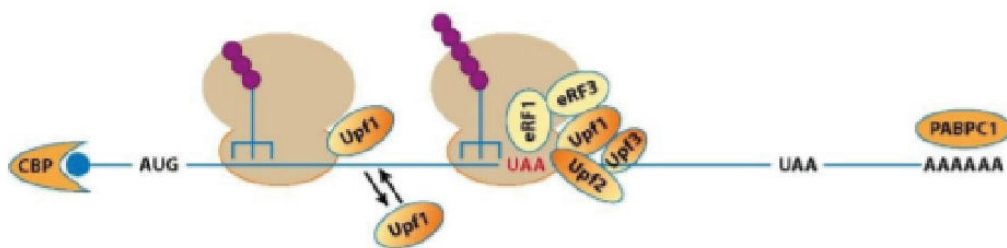


Figure 13 : Représentation schématique des modèles proposés pour le recrutement et l'activation d'UPF1 durant le NMD. Quatre modèles sont décrits. A) UPF1 est recrutée sur un ribosome en arrêt, puis activée par l'interaction avec un complexe EJC en aval du ribosome. B) UPF1 est recrutée au niveau des longs 3'UTRs, et activée par un mécanisme inconnu. C) UPF1 est recrutée auprès du ribosome quand la terminaison de la traduction est inefficace. D) UPF1 se lie de façon transitoire aux ARNm mais ne devient active qu'après interaction avec UPF2 et UPF3 (D'après He et Jacobson 2015).

1.2.3.3.1 Le modèle EJC-dépendant

Lors de son premier passage sur un ARN nouvellement exporté dans le cytoplasme, le ribosome décroche durant l'élongation de la traduction les complexes EJC présents sur l'ARNm. Lorsqu'un codon stop est situé au niveau du site A du ribosome, il s'arrête et recrute le complexe SURF (Figure 13A). Il est constitué des facteurs de terminaison eRF1 et eRF3, de l'hélicase UPF1 et de la kinase Smg1 (Kashima et al. 2006). S'il s'agit d'un codon stop précoce, un complexe EJC sera généralement présent en aval (sauf si le codon stop précoce est dans le dernier exon). UPF3, associé à l'EJC recrute UPF2 qui peut interagir avec UPF1 du fait de la proximité de l'EJC et du ribosome arrêté. Cette interaction entraîne la phosphorylation d'UPF1 par Smg1. Il s'en suit la dissociation des facteurs d'élongation eRF1 et eRF3 ainsi que le décrochage du ribosome. Le complexe UPF1-Smg1-UPF2-EJC est appelé DECID (Decay-inducing complex). Ces différentes interactions permettent l'activation de l'activité hélicase d'UPF1. Cette dernière peut alors s'associer à PNRC2 responsable du recrutement du complexe DCP1-DCP2, capable d'hydrolyser la coiffe de l'ARNm (T. Lai et al. 2012). Chez l'homme et la drosophile, l'activation d'UPF1 entraîne le recrutement de l'hétérodimère SMG5-SMG7, qui peut ensuite recruter l'endonucléase SMG6 (Glavan et al. 2006; Huntzinger et al. 2008; Loh, Jonas, et Izaurralde 2013). SMG6 est responsable de la coupure endonucléolytique de l'ARNm grâce à son domaine PIN.

Alternativement, l'hétérodimère SMG5-SMG7 peut recruter le complexe CCR4-NOT permettant la désadénylation du transcrit. Lorsque la coiffe de l'ARNm est hydrolysée, que sa queue poly(A) est raccourcie et qu'il a subi le clivage endonucléolytique par SMG6, sa dégradation complète est effectuée de 5' en 3' par XRN1, et dans le sens inverse par l'exosome (Hug, Longman, et Cáceres 2016).

1.2.3.3.2 Le modèle de détection des 3'UTR

Un autre modèle propose qu'UPF1 est recruté au niveau des longs 3'UTRs. En effet la présence d'un codon stop précoce entraîne la présence d'un 3'UTR de l'ARNm plus long et une étude a montré qu'UPF1 aux 3'UTR indépendamment de la séquence, mais en fonction de la longueur du 3'UTR (Hogg et Goff 2010). Le mécanisme d'activation d'UF1 dans ce modèle reste inconnu (Figure 13B).

1.2.3.3.3 Le modèle des Faux-3'UTR

Ce troisième modèle provient de l'observation qu'une terminaison précoce est moins efficace et que les transcrits comportant un long 3'UTR sont des cibles préférentielles du NMD. L'hypothèse de ce modèle est que l'interaction entre les facteurs de terminaison et les protéines présentes sur le 3'UTR des transcrits, comme PABPC1, permettent une terminaison efficace (Isabelle Behm-Ansmant et al. 2007). D'après ce modèle, lorsque la distance séparant ces protéines des facteurs de terminaison est trop grande UPF1 est recruté et activé (Figure 13C).

1.2.3.3.4 Le modèle de liaison transitoire d'UPF1

Un autre modèle propose qu'UPF1 s'associe de manière transitoire aux ribosomes en élongation sur tous les ARNm en traduction, mais n'est activé que par les événements de terminaison inhabituels se produisant aux PTC, tels que le recrutement et l'action différée d'eRF1 et eRF3 ou le manque d'activité d'ABCE1 (Figure 13D).

1.2.4 Autres mécanismes de dégradation impliquant UPF1

En plus du NMD, UPF1 est aussi impliqué d'autres voies de dégradation comme dans le Staufen-mediated mRNA decay (SMD) où la protéine STAU1 ou STAU2 se fixe sur une structure secondaire SBS (STAU-binding site) dans le 3' UTR de l'ARN cible. Lorsque la protéine STAU est fixée sur le SBS, elle recrute directement UPF1 sur le ribosome bloqué en amont et est activé pour entraîner la dégradation de l'ARN cible (Y. K. Kim et Maquat 2019).

UPF1 est aussi impliqué dans la dégradation des ARNm d'histones qui ne possèdent pas de queue poly(A). En revanche ces ARNm possèdent une tige boucle dans leur région 3'UTR. La protéine SLBP se fixe sur cette structure et lorsque la réplication de l'ADN est inhibée ou terminée, UPF1 est recrutée et phosphorylée. Ceci entraîne le recrutement de TUT7 permettant l'ajout d'une queue poly(U). Lsm1-7 se fixe sur cette dernière et recrute les facteurs d'hydrolyse de la coiffe Dcp1/2 suivi de la dégradation bidirectionnelle de l'ARNm par Xrn1 et l'exosome cytoplasmique (Mullen et Marzluff 2008; Marzluff et Koreski 2017).

De la même manière UPF1 est impliquée dans la voie RMD (« Regnase 1-mediated mRNA decay »). Cette voie cible des ARNm dit inflammatoires qui contiennent une structure CDE (« constitutive decay element ») formant une tige-boucle qui peut être reconnu par la Regnase 1 qui recrute UPF1 sur le ribosome en terminaison. La

Regnase 1 va induire une coupure de l'ARN grâce à son domaine endonucléasique PIN. L'activation d'UPF1 dans cette voie n'a pas été étudiée pour le moment (Y. K. Kim et Maquat 2019).

Le Glucocorticoid receptor-mediated mRNA decay (GMD) implique également l'hélicase UPF1. Les ARNm cibles de cette voie de dégradation portent une structure secondaire forte dans leur région 5'UTR. Le récepteur au Glucocorticoïde se fixe sur cette dernière, fixe un Glucocorticoïde puis recrute UPF1, DCP1A et PNCR2. Lorsqu'UPF1 est activée, d'autres facteurs sont recrutés entraînant l'hydrolyse de la coiffe suivi d'une dégradation bidirectionnel de l'ARN cible (Park et al. 2016).

1.2.5 Dégradation cytoplasmique des ARN non-codants

Comme indiqué ci-dessus, les ARNt sont sujets à de nombreuses modifications chimiques et possèdent de nombreuses structures internes. Ceci les rend insensible à la plupart des mécanismes de dégradation cités précédemment. Ce sont donc des ARN très stables. Leur dégradation chez l'Homme est très peu connue. Xrn1 semble être impliqué dans la dégradation de leur extrémité 5' (Łabno, Tomecki, et Dziembowski 2016). Ces dernières années il a été montré que les ARNt sont clivés afin de produire d'une variété de transcrits plus courts, appelés fragments dérivés d'ARNt (tRF). Il a été suggéré que les tRF uridylés pourraient être des substrats de DIS3L2 dans des cellules humaines (Ustianenko et al. 2016).

Les ARNr sont aussi très stables et ne semblent pas être ciblés pour dégradation tant qu'ils sont fonctionnels. Cependant, un mécanisme de contrôle de qualité à été mis en évidence. Il est appelé "nonfunctional rRNA decay" (NRD) et implique l'exosome, Ski7 et Xrn1 chez la levure (Cole et al. 2009).

Les ARN Y et les ARN vault qui sont tous les deux des petits ARNnc transcrits par la Pol III sont uridylés par des TUTases en 3' puis dégradés par Dis3L2. Plusieurs voies de dégradation des snARN défectueux ont été mises en évidence. La coiffe m7G est clivée par DCP1/DCP2 suivi d'une dégradation par Xrn1 ou ils subissent une uridylation par des TUTases suivi d'une dégradation par Dis3L2 (Luan et al. 2019).

Les snARN aberrants peuvent être dégradé par l'exosome nucléaire, par la voie 5'-3' à savoir DCP1/DCP2 suivi de Xrn1 ou par l'uridylation puis la dégradation par Dis3L2. Les miARN peuvent être dégradés par la plupart des voies de dégradation décrites précédemment (Łabno, Tomecki, et Dziembowski 2016).

1.2.6 Dégradation des ARN exogènes

Chez l'Homme, la famille RNase A comportant les RNases 1 à 8 joue un rôle important dans l'immunité innée de différentes façons.

Les gènes des huit RNase catalytiquement actives de la famille RNase A sont présents sur le chromosome 14. Ces protéines sont sécrétées par de nombreux types cellulaires et tissus. Même si leur rôle physiologique n'est pas bien connu, plusieurs fonctions ont été données à ces RNases. Elles possèdent toutes une ou plusieurs activités antibactérienne, antivirale, antifongique, ou cytotoxique contre des parasites ou même des cellules hôte (Koczera et al. 2016).

La RNase 1 est produite en majorité dans les cellules endothéliales, puis excrétée dans le sang où elle exerce son activité nucléase sur les ARN simple brin, double brin ainsi que sur les hybrides ARN-ADN (Koczera et al. 2016). Elle y permet la normalisation de la viscosité sanguine ainsi qu'une activité antivirale contre le VIH (Rugeles et al. 2003). Dans les tissus il a été montré qu'elle est capable de stimuler la maturation des cellules dendritiques (D. Yang et al. 2004).

Les RNase 2 et 3 quant à elles sont produites par les éosinophiles et sécrétés dans les granules secondaires éosinophiles (Koczera et al. 2016). La RNase 2 est aussi appelée EDN (eosinophil-derived neurotoxin). L'activité catalytique de cette dernière est nécessaire à l'activité antivirale qu'elle exerce sur de nombreux virus à ARN simple brin (Domachowske et al. 1998). La RNase 3, aussi appelée ECP (eosinophil cationic protein), possède le même effet antiviral que la RNase 2 mais possède aussi une activité antibactérienne et est capable d'induire la dégranulation des mastocytes (Venge et al. 1999).

Les rôles de la RNase 4 sont mal connus, cependant il existe un lien entre un variant non-fonctionnel de cette protéine et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Padhi et al. 2019). Plusieurs mutations dans la RNase 5, connue sous le nom d'angiogénine, ont été identifiées dans les patients atteints de SLA. La RNase 5 a une activité catalytique faible mais essentielle pour l'angiogénèse. Cette RNase est capable de cliver les ARNt au niveau de la boucle anticodon (Lyons et al. 2016).

La RNase 6 est présente principalement dans le tractus urinaire et possède des activités antibactériennes et antivirales (Lu et al. 2018). La RNase 7 est présente en grande quantité dans les kératinocytes de la peau. C'est l'une des défenses majeures

des épithéliums, dont la peau, contre les bactéries (B. Wang 2017). Enfin, la RNase 8 a une séquence similaire à celle de la RNase 7 mais elle est exprimée dans le placenta, les poumons, le foie et les testicules. Elle possède une activité antifongique ainsi qu'une activité antibactérienne capable d'éradiquer une infection de bactéries multi-résistantes comme *Staphylococcus aureus* (Lu et al. 2018; Koczera et al. 2016).

En plus de la famille des RNases A, on peut citer l'endoribonucléase RNase L, qui est activée lors d'une infection virale ou bactérienne. Elle est responsable de l'activité enzymatique de la voie OAS/RNase L clivant des ARN exogènes simple brin. Lors d'une infection virale, de l'interféron (IFN) est sécrété. L'IFN induit alors de façon transcriptionnelle de nombreux gènes codant pour des protéines participant à la réponse antivirale. Ces protéines sont activées par l'ARN double brin virale et synthétisent des oligoadénylates de liaison phosphodiester 2',5' (2-5A). Ces derniers activent la RNase L qui dégrade ensuite les ARN viraux. En plus de son rôle dans l'immunité innée, la RNase L est aussi importante lors de l'apoptose et de certaines différenciations cellulaires en régulant l'expression et la stabilité de certains ARN cellulaires (Bisbal et Salehzada 2008; Nogimori et al. 2019).

Il a aussi été démontré qu'une infection virale induit une exportation de ZCCHC7 et Mtr4 vers le cytoplasme pour faciliter la dégradation de l'ARN viral induite par l'exosome dans le cytoplasme (Molleston et al. 2016).

1.2.7 Les hélicases et les RNases sont présents tout au long de la vie des ARN

1.2.7.1 Généralités sur les hélicases

Ces enzymes sont conservées dans tous les règnes du vivant ainsi que dans les virus. L'enzyme Tral d'*E. coli*, une hélicase à ADN, est la première hélicase à être purifiée et caractérisée en 1976 (Abdel-Monem, Dürwald, et Hoffmann-Berling 1976).

Par définition, ces hélicases utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse d'un NTP afin d'avancer et de dérouler un double brin d'acides nucléiques Figure 14. Elles ont été identifiées à l'origine par une série de motifs conservés (Gorbalenya et Koonin 1993). Plus récemment, il est devenu évident que ces motifs sont en fait caractéristiques de protéines capables de se déplacer directionnellement le long des brins d'ADN et/ou d'ARN. Il serait donc plus correct d'appeler toutes les protéines portant ces motifs

conservés des translocases, dont les hélicases sont un sous-groupe (Singleton, Dillingham, et Wigley 2007).



Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de translocation des enzymes SF1. Les trois étapes du processus de translocation associées à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP sont présentées (Figure de Singleton, Dillingham, et Wigley 2007).

Il a été démontré que ces hélicases peuvent jouer de nombreux rôles en dehors de la séparation d'un double brin d'acides nucléiques. Par exemple, l'hélicase eIF4A3 agit comme une pince essentielle à l'assemblage du complexe protéique EJC jouant un rôle dans l'épissage et le NMD (Ballut et al. 2005). Il a été démontré que certaines hélicases sont capables d'éliminer des obstacles tels que des protéines attachées sur son chemin (Singleton, Dillingham, et Wigley 2007).

Les hélicases jouent un rôle essentiel dans tous les mécanismes impliquant des acides nucléiques dont le métabolisme des ARN (Rocak et Linder 2004).

Les hélicases possèdent des caractéristiques biochimiques et biophysiques variées. On peut les différencier par leur polarité, en effet, elles fonctionnent dans le sens 5'-3' ou 3'-5' ou plus rarement dans les deux sens. On distingue aussi les hélicases pouvant se fixer sur un double brin d'acide nucléique ou sur un simple brin. Elles peuvent être spécifiques de l'ADN ou de l'ARN ou se fixer sur les deux. La processivité ainsi que la distance du pas, c'est-à-dire la distance parcourue à chaque cycle, font aussi parties des caractéristiques de ces enzymes.

Ces protéines ont été classées en six superfamilles en fonction de leur structure et de leurs fonctions au sein de la cellule (Singleton, Dillingham, et Wigley 2007). Les protéines des superfamilles SF1 et 2 agissent sous forme de monomère ou dimère alors que celles des superfamilles SF3 à 6 agissent essentiellement sous forme d'hexamère. La SF3 comprend des hélicases virales 3'-5'. La SF4 regroupe des hélicases 5'-3' souvent associées à des primases. Les protéines Rho constituent la SF5.

Dans la SF6 on retrouve les hélicases RuvB, qui sont des ADN translocases double brin, et les hélicases réplcatives MCM (mini chromosome maintenance).

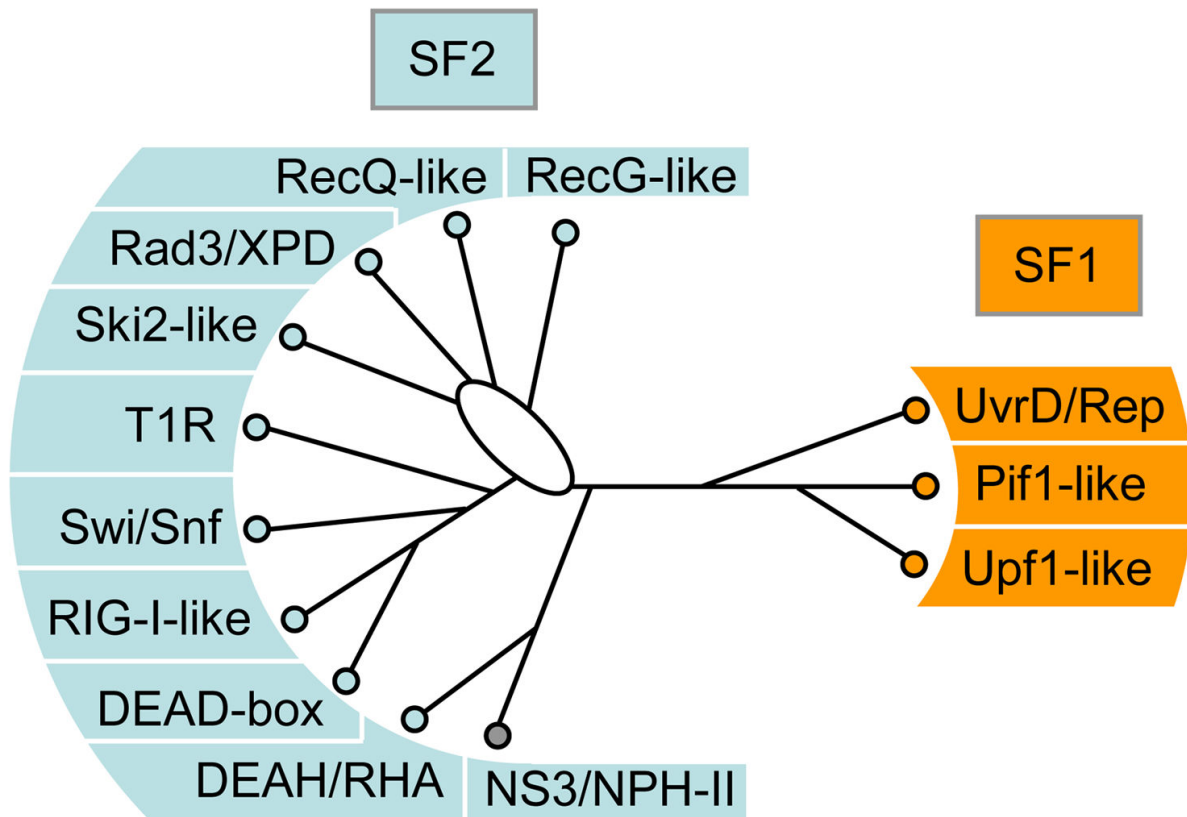


Figure 15 : Arbre phylogénétique des différentes familles d'hélicases agissant sous forme de monomère ou dimères (Figure de Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010).

SF1 et SF2 regroupent la majorité des hélicases identifiées qui possèdent un cœur formé de deux domaines RecA-like en tandem nommés RecA1 et RecA2. Les hélicases SF1 ont été réparties en 3 familles et les hélicases SF2 en 10 familles (Figure 15) (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010).

1.2.7.2 La famille UPF-1like

Chez l'homme, cette famille compte 11 membres qui sont SETX, AQR (ou IBP160), ZNFX1, UPF1, SMBP2 (ou IGHMBP2), DNA2, MOV10, MOV10L1 (ou M10L1), HELZ, HELZ2 et ZGRF1 (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010). Elle fait partie de la super-famille SF1 et a la particularité de comporter des hélicases à ADN et à ARN.

La protéine humaine UPF1 est la plus étudiée, comme le montre ses nombreuses implications dans la vie des ARN décrites ci-dessus. Elle possède plusieurs activités biochimiques et est monomérique en solution. Elle est capable d'hydrolyser l'ATP et

cette activité est stimulée par l'ajout de poly(dT) et poly(dA) et dans une moindre mesure par l'ajout de poly(rA), poly(rA:rU), poly(rU) et poly(dA:dT) (Bhattacharya et al. 2000). En absence d'ATP, elle est capable de lier des substrats ADN et ARN sans spécificité de substrat. Enfin, il a été montré que UPF1 est capable d'ouvrir les duplexes d'ADN et d'ARN dans le sens 5'-3'. Cette activité nécessite une extrémité simple brin afin de charger la protéine (Bhattacharya et al. 2000).

La protéine UPF1 humaine contient trois domaines (Figure 17). Le domaine CH en N-terminal, un domaine hélicase central, et un domaine SQ en C-terminal. Le domaine CH, riche en cystéines et histidines, réduit la vitesse et l'amplitude de l'activité hélicase d'UPF1 et son interaction avec UPF2-UPF3 lève l'inhibition causée par le domaine CH (Chamieh et al. 2008).

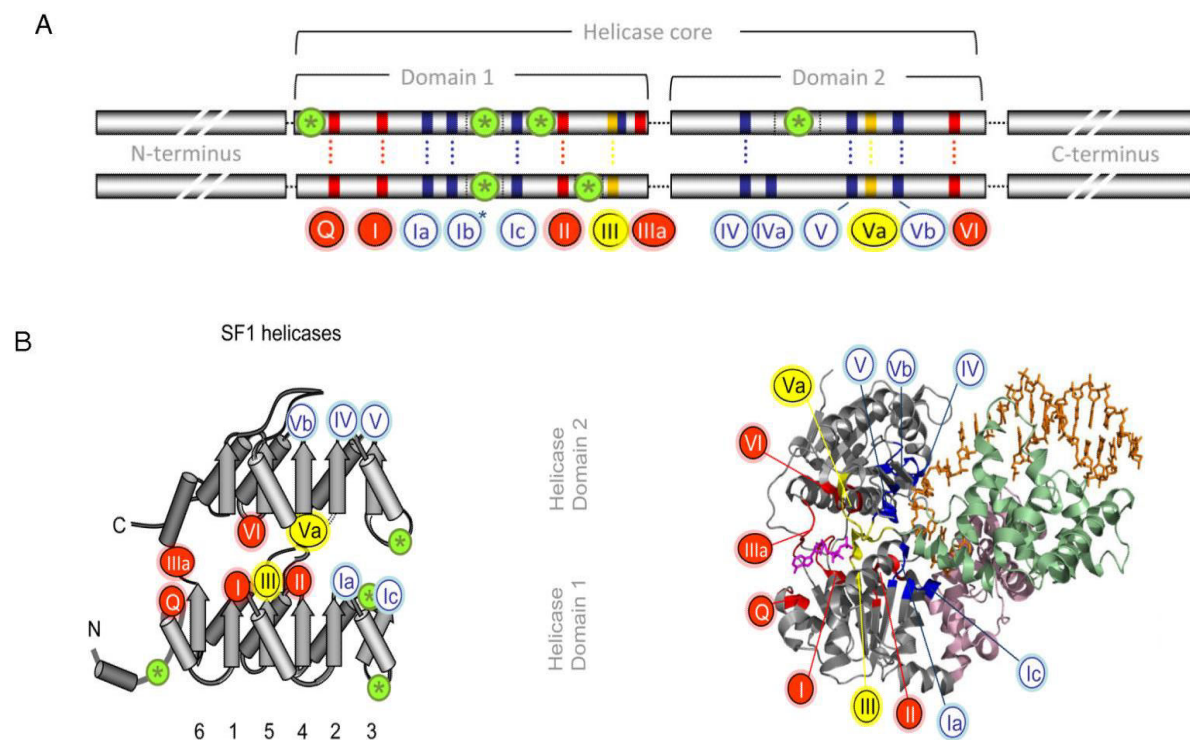


Figure 16 : Organisation de séquence et structurale des hélicase SF1 et SF2. (A) Organisation de la séquence du cœur des hélicases SF1 (en haut) et SF2 (en bas). Les motifs de séquence caractéristiques sont colorés en fonction de leur fonction biochimique: rouge, liaison et hydrolyse de l'ATP ; jaune, coordination entre les sites de liaison aux acides nucléiques et au NTP; bleu, liaison aux acides nucléiques. Les astérisques dans un cercle vert indiquent l'insertion de domaines supplémentaires. (B) Représentation schématique de la structure (à gauche) et structure tridimensionnelle (à droite) des hélicase SF1 (Figure de Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010).

Dans les domaines RecA1 et RecA2 des hélicases SF1 et SF2 on retrouve 13 motifs conservés: Q, I, II, IIIa, et VI impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ; les motifs de surface Ia, Ib, Ic, IV, V, et Vb impliqués dans la liaison à l'ARN et les motifs III et Va qui sont impliqués dans la coordination entre les groupes précédant (Figure 16) (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010). Deux sous-domaines sont insérés au sein du RecA1 du cœur hélicase d'UPF1-like. Ils sont nommés 1B et 1C et présentent chacun un repliement caractéristique. Ces sous-domaines sont aussi appelés protrusions et sont caractéristiques de la famille des hélicases UPF1-like. La mutation DE 647-648 AA dans le motif II est connue pour abolir totalement l'activité ATPase de UPF1 (Cheng et al. 2007).

Le motif SQ, riche en sérines et glutamines, est aussi capable d'inhiber l'activité du domaine hélicase. Il a été montré qu'UPF1 est capable de lier l'ATP mais l'hydrolyse de cette dernière est inhibée en présence du domaine SQ (Fiorini, Boudvillain, et Le Hir 2013). Les mécanismes qui permettent de lever l'inhibition du domaine SQ ne sont pas encore connus. Le motif SQ possède de nombreux sites de phosphorylation et permet d'interagir avec plusieurs protéines dont la kinase Smg1 lors du NMD (Okada-Katsuhata et al. 2012). Il est possible que l'un de ces facteurs soit capable de lever l'inhibition du domaine SQ sur l'activité ATPase d'UPF1.



Figure 17 : Représentation schématique de la disposition des domaines pour la protéine UPF1 humaine (hUPF1). Le domaine CH (vert) est responsable de l'interaction avec UPF2, eRF1 et eRF3. La région hélicase contient deux domaines RecA (jaune). Les domaines de régulation supplémentaires incluent le domaine 1B (orange) et le domaine 1C (rouge). Le domaine SQ est responsable de l'interaction avec Smg1, Smg5, Smg6 et Smg7 (Figure de Martínez-Montiel et al. 2016).

On note aussi la présence de SETX dans cette même famille qui joue un rôle dans la terminaison de la transcription comme décrit précédemment dans cette introduction (Han, Libri, et Porrua 2017).

La protéine DNA2 est une enzyme clé impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN dans le noyau et la mitochondrie. Elle joue un rôle majeur dans le traitement des fragments d'Okazaki en collaboration avec FEN1. Elle est également impliquée dans la coupure de l'extrémité 5' de l'ADN lors de la réparation d'une rupture à double brin

(DSB). Elle possède différentes activités enzymatiques, à savoir une activité ATPase dépendante d'ADN simple brin, une activité hélicase 5'-3' et une activité endonucléase. Alors que les activités ATPase et endonucléase sont bien définies et jouent un rôle clé dans le traitement des fragments d'Okazaki et la réparation de DSB, l'activité de l'ADN hélicase 5'-3' est controversée puisqu'elle semble faible et sa fonction inconnue (Pawłowska, Szczepanska, et Blasiak 2017; Kang, Lee, et Seo 2010).

Quant à HELZ, il a été montré dans un premier temps que sa surexpression dans les cellules humaine active la traduction globale des protéines alors que son inhibition induite par une interférence par ARN a l'effet opposé (Hasgall et al. 2011). Dans la même étude, il a été montré que HELZ interagit avec la PABP via un motif PAM2. Une seconde étude récente a montré que HELZ était associé à divers facteurs de dégradation de l'ARNm, y compris des composants du complexe CCR4-NOT dans des cellules humaines et de drosophile (Hanet et al. 2019). L'interaction entre HELZ et le complexe CCR4-NOT semble être directe et induite par des régions de faible complexité dans la partie C-terminale de la protéine. Cette étude montre que cette interaction est nécessaire pour assurer la médiation de la répression traductionnelle et de la dégradation de l'ARNm dépendant de l'hydrolyse de la coiffe. Une analyse transcriptomique de cellules HELZ^{-/-} suggère que HELZ joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes associés au développement du système nerveux (Hanet et al. 2019).

MOV10 et MOV10L1 sont deux facteurs impliqués dans le métabolisme des petits ARN non-codant. MOV10 est un membre du complexe RISC (Meister et al. 2005; C. Liu et al. 2012) et possède une activité antivirale contre le virus de la Dengue (Balinsky et al. 2017). MOV10L1 est essentielle pour la spermatogenèse car elle se lie spécifiquement aux précurseurs des piARN et agit sur leur maturation, cela entraîne la répression des transposons durant la méiose (Frost et al. 2010; Zheng et al. 2010; Vourekas et al. 2015).

AQR (ou IBP160), est impliquée dans l'épissage des pré-ARNm en tant que composant du spliceosome (Jurica et al. 2002; De et al. 2015).

La protéine SMBP2 (ou IGHMBP2), a été liée à la réplication de l'ADN, l'épissage et la transcription de pré-ARNm, mais sa fonction précise dans tous ces processus reste inconnue (Guenther et al. 2009). Cette protéine est mutée dans l'amyotrophie spinale

avec détresse respiratoire de type 1 (SMARD1) et la maladie de Charcot-Marie-Tooth axonale sans atteinte diaphragmatique.

Les fonctions de ZNFX1 et ZGRF1 ne sont pas connues.

1.2.7.3 Généralités sur les RNases

Comme observé au long de cette introduction, les RNases sont omniprésentes dans la vie des ARN. Elles ont été regroupées en différentes familles en se basant sur des homologies de séquences et des informations structurales. Ces différentes familles peuvent être classées en deux types : les endoribonucléases vont agir au sein de la chaîne ribonucléotidique tandis que les exoribonucléases vont agir au niveau de l'une des extrémités de la chaîne ribonucléotidique (Figure 18).

Dans ce dernier cas, on distingue les exoribonucléases selon qu'elles agissent dans la direction 5' vers 3' ou 3' vers 5' de la chaîne ribonucléotidique. Deux types de réactions catalytiques existent pour briser la liaison nucléotide-nucléotide : l'activité phosphorolytique ou l'activité hydrolytique. Les enzymes phosphorolytiques utilisent, avec l'ARN, un phosphate inorganique comme substrat tandis que les enzymes hydrolytiques utilisent une molécule H₂O.

Les RNases contiennent un ou plusieurs ions métalliques dans leurs sites actifs. L'affinité de ces enzymes avec les différents ions permet également de distinguer certaines familles des autres.

En fonction de leur processivité, c'est-à-dire leur capacité à dégrader des nucléotides successivement sans se décrocher de l'ARN, ces enzymes peuvent soit être processive ou distributive. Certaines de ces enzymes sont localisées dans le noyau, d'autres dans le cytoplasme et certaines peuvent être excrétées dans l'espace extracellulaire.

On peut distinguer les RNases qui sont libres de celles qui font parties d'un complexe protéique. Un autre critère de classification utilisé est la spécificité des substrats que l'enzyme est capable de catalyser. Elles peuvent être capable dégrader des ARN simple brin, double brin ou encore des duplexes ADN-ARN. Les RNases peuvent aussi posséder ou non une spécificité de séquence (Arraiano et al. 2013).

Exoribonucleases.

Family	Some prokaryotic members	Some eukaryotic members	Catalytic mechanism	Comments
DEDD	RNase D RNase T Orn	Pop2/Caf1 Pan2 PARN Rrp6 Rex2-4, Eri1/3'hexo/Snipper	Hydrolytic	3' to 5' activity Some members have sequence specificity (deadenylases) Family members can be processive or distributive Distant family members include DNases and polymerases
RNase II/RNB	RNase II RNase R	Dis3 (Rrp44)/Dis3L1/Tazman Dis3L2/SOV Dss1 Ssd1	Hydrolytic	These enzymes are processive in the 3' to 5' direction Distributed by all domains of life
PDX	RNase PH PNPase Archeal exosomes	Plant Rrp41	Phosphorolytic	One or two PDX domains per protein Associate to form ring structures containing 6 PDX domains Many PDX domains are catalytically inactive, particularly in eukaryotes (Rrp41-43, 45, 46, Mtr3)
EEP	-	Ccr4 Nocturnin Ng1-3	Hydrolytic	3' to 5' activity Some members have sequence specificity (deadenylases) Distant family members include DNases and phosphatases
DHH	NrnA NrnB	-		Also called nano RNases Decay polarity controversial Distant family members include DNases and phosphatases
Xm1/Rat1	-	Xrn1/Pacman Rat1/Xrn2	Hydrolytic	5' to 3' decay Distantly structurally related to RNase H and FLAP nucleases

Ribonuclease families with endo- and exonuclease members.

Family	Some prokaryotic members	Some eukaryotic members	Comments
β -lactamase domain	RNase J RNase Z	CPSF73 Int9/11 RNase Z	Family members can be 5'-3' exonucleases, endonucleases, or have dual activity Often dimeric (homo- or heterodimeric) Hydrolytic Distant family members are involved in distinct hydrolytic reaction (antibiotic destruction, ...)
HD	RNase Y YhaM	-	Includes endonucleases and 3'-5' exonucleases Members belong to a large family of metal dependent phosphohydrolases acting on diverse substrates

Endoribonucleases.

Family	Some prokaryotic members	Some eukaryotic members	Comments
RNase E/G	RNase E RNase G	Plant RNase E	Cleave single-stranded RNA Distantly related to DNase I
RNase III	RNase III	Rnt1 Drosha Dicer	Cleave double stranded RNA
RNase H	RNase HI, HII and HIII	RNase H1 and H2 Argonautes	Cleave RNA in RNA-DNA or RNA-RNA duplexes
Reg B	Reg B	-	Targets mRNA preferentially near the Shine-Dalgarno region
PIN domains	-	Smg6 Dis3 (Rrp44)/ Dis3L1/ Tazman	Cleave single-stranded RNA Occur sometimes in combination with other nuclease domains
Ferredoxin-like	Cas nucleases	-	Highly specific for CRISPR RNAs Targeted by sequence and structure
Zucchini	-	Zucchini	Cleave single-stranded RNA Involved in PIWI RNA biosynthesis

Figure 18 : Classification des différentes familles de RNases. Des exemples procaryotes et eucaryotes sont donnés pour chaque famille. Les caractéristiques majeures connues de chaque famille sont décrites dans la dernière colonne (Arraiano et al. 2013).

Des mutations de ces RNases sont généralement associées à des pathologies graves chez l'homme comme des maladies génétiques ou le développement de certains cancers.

1.2.7.4 La famille des RNaseII/RNB

Parmi toutes les ribonucléases, la famille des RNaseII/RNB est caractérisée par la présence d'un domaine conservé appelé domaine RNB. Initialement caractérisées chez *Escherichia coli*, la RNaseII et la RNaseR sont les représentantes de cette famille. Chez *E. coli* la RNaseII contribue à la maturation des ARNt tandis que la RNaseR est impliquée dans le contrôle de la qualité des ARN synthétisés, ainsi que dans la dégradation des ARNt défectueux et des fragments résultants de la maturation des ARNr 16S et 23S (Reis et al. 2013). La RNaseII a été purifiée pour la première fois en 1964 par Spahr (Spahr 1964) et dégrade les ARN simple brin sans spécificité de séquence. Les domaines fonctionnels de cette protéine ont été caractérisés : en N-terminal, deux domaines de type « cold shock » (CSD) sont présents et en C-terminal se trouve un domaine de type S1 (Barbas et al. 2008). Ces deux domaines permettent la liaison de la protéine à l'ARN. Au centre de la chaîne polypeptidique se trouve le domaine catalytique qui fait 400 acides aminés repartis en quatre motifs et qui est appelé le domaine RNB. Dans le premier motif, quatre acides aspartique (D) sont très conservés et essentiels pour l'activité de la RNase II : D201, D207, D209 et D210. Ces résidus sont importants pour la coordination d'ions Mg^{2+} dans la poche catalytique nécessaires pour le clivage du substrat ARN. Cependant, les quatre acides aspartiques n'ont pas la même importance puisque la mutation D207N suggère que la réduction d'activité serait moindre avec un facteur de 8 fois ou 40 fois par rapport à la protéine sauvage selon l'étude (Barbas et al. 2008; Zuo et al. 2006). Ceci suggère que l'aspartate présent à cette position n'a pas réellement un rôle catalytique. Des études structurales plus récentes suggèrent qu'il pourrait coordonner le résidu 3' du dernier nucléotide de l'ARN substrat (Makino, Baumgärtner, et Conti 2013). Les mutations D201N et D210N entraînent une réduction plus drastique, avec une activité relative restante de moins de 0.3%. Finalement, l'aspartate D209 est indispensable puisque sa mutation en asparagine (N) abolit complètement l'activité exoribonucléasique (Barbas et al. 2008).

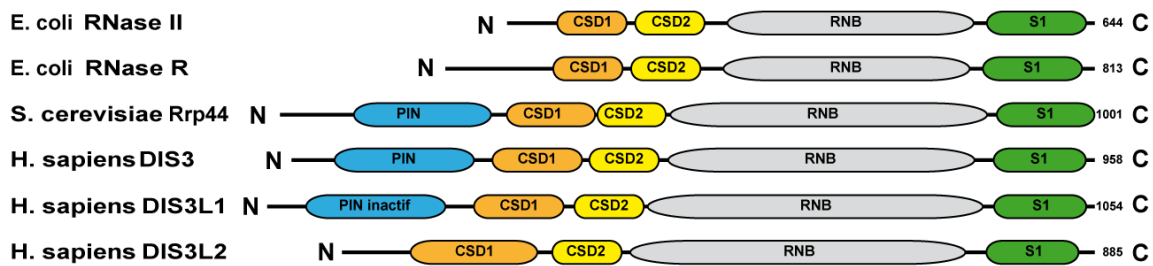


Figure 19 : Représentation schématique de protéines de la famille RNaseII/RNB. Toutes ces protéines comportent un domaine RNB exoribonucléasique (gris) et des domaines de liaison à l'ARN de part et d'autre des « cold shock domain » CSD1 et 2 (orange et jaune) et un domaine S1 (vert). Certaines possèdent aussi un domaine PIN endoribonucléasique (bleu).

Chez l'homme, trois protéines de la famille des RNaseII/RNB sont connues actuellement, à savoir DIS3, DIS3L1 et DIS3L2. Seules DIS3 et DIS3L1 interagissent avec l'exosome grâce à la présence d'un domaine PIN à leur extrémité N-terminale (Rafal Tomecki et al. 2010).

La protéine DIS3 possède une architecture similaire aux protéines bactérienne de cette famille décrite ci-dessus. Cependant, comme mentionné précédemment, elle possède une activité endonucléasique supplémentaire en plus de l'activité exonucléasique du domaine RNB. Cette activité est conférée par la présence d'un domaine PIN à son extrémité N-terminale. Comme évoqué précédemment, la protéine Dis3, aussi connue sous le nom de Ribosomal RNA-processing protein 44 (Rrp44), est la sous-unité catalytique de l'exosome nucléaire (Lebreton et al. 2008; Chlebowski et al. 2013).

Des mutations de DIS3 ont été identifiées dans le myélome multiple et la leucémie à plasmocytes (Robinson et al. 2015) (Figure 20). Ces mutations sont principalement des mutations faux-sens localisées dans le domaine RNB pouvant être associées à des translocations de la chaîne lourde des immunoglobulines (Lionetti et al. 2015; Weißbach et al. 2015). Des mutations de DIS3 ont également été trouvées dans la leucémie aiguë myéloïde et le médulloblastome (Parsons et al. 2011; Ding et al. 2012). Bien que les mutations dans le domaine PIN aient peu d'impact sur la physiologie cellulaire, les mutations simultanées dans les domaines PIN et RNB retrouvées dans certains myélomes multiples sont létales dans les cellules humaines (R. Tomecki et al. 2014). Ainsi, cibler le domaine PIN de DIS3 ne devrait être létal que pour les cellules

cancéreuses hébergeant une mutation du domaine RNB de Dis3 par un effet synthétique létal. Le domaine PIN de Dis3 a donc été proposé comme nouvelle cible thérapeutique pour traiter les cancers humains (R. Tomecki et al. 2014; Reis et al. 2013). D'autres mutations de Dis3 ont été retrouvées dans certains mélanomes, des cancers du foie, colorectaux et ovariens (Saramago et al. 2019).

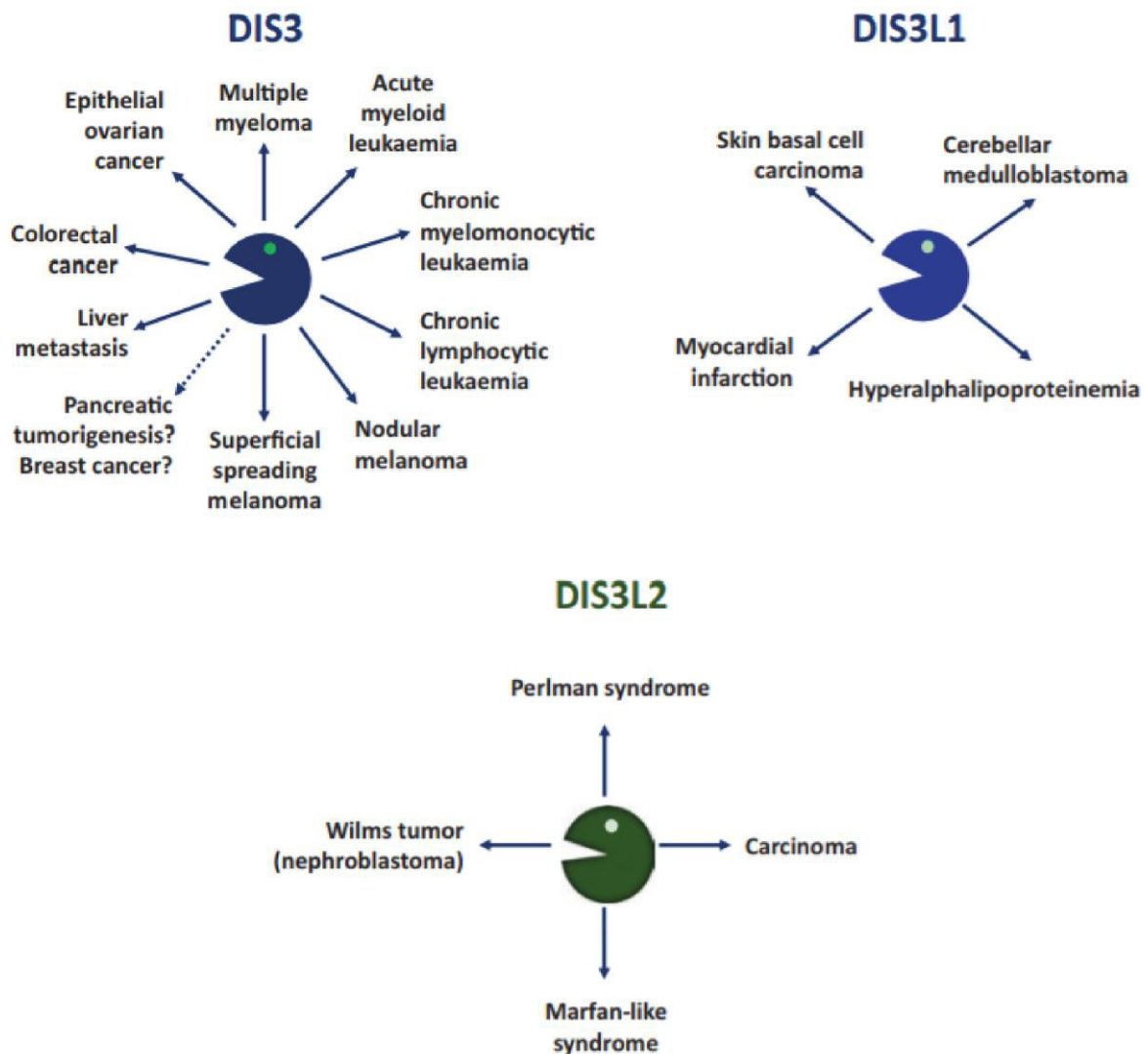


Figure 20 : Schéma des maladies humaines qui ont été liées à une surexpression ou à un dysfonctionnement des enzymes de la famille RNaseII/RNB. Les flèches en pointillés correspondent aux corrélations nécessitant une confirmation supplémentaire (Figure de Saramago et al. 2019).

La protéine cytoplasmique Dis3L1 possède la même architecture que son homologue nucléaire Dis3 à la différence que son domaine PIN n'est pas catalytiquement actif. Elle a été décrite simultanément par deux équipes en 2010 (Staals et al. 2010; Rafal Tomecki et al. 2010). Comme discuté précédemment elle est la sous-unité catalytique

de l'exosome cytoplasmique et joue donc un rôle important dans la dégradation des ARNm fonctionnels et aberrants dans les différentes voies de contrôle de qualité. Des mutations de cette enzyme ont été mises en relation avec le carcinome basocellulaire, au médulloblastome cérébelleux. Des études ont montré un lien entre des SNPs dans Dis3L1 avec un risque cardiaque et une hyperlipoprotéinémie (Saramago et al. 2019). Des mutations germinales dans le gène codant pour DIS3L2 sont associées au syndrome de Perlman ainsi qu'au développement de tumeurs de Wilms (Astuti et al. 2012). Dis3L2 a aussi été associé au syndrome de Marfan, les patients touchés ont subi un surdéveloppement osseux ainsi que des malformations. Il a aussi été montré que Dis3L2 est muté dans 3 à 6% des carcinomes (Saramago et al. 2019).

Les trois protéines humaines connues de la famille des RNaseH/RNB sont très importantes voire essentielles pour les cellules. De plus des mutations ou variations dans ces dernières sont associées à de nombreuses maladies. Il est donc important d'identifier et de caractériser toutes les protéines de cette famille chez l'Homme, ce qui est le but de cette thèse. Une protéine humaine comportant un RNB potentiel a été identifiée durant cette thèse. Le projet de thèse inclut la caractérisation biochimique des différents domaines de cette protéine. L'autre objectif majeur est de comprendre les mécanismes dans lesquels cette protéine est impliquée *in vivo* en identifiant ses partenaires protéiques et ses ARN cibles.

2. Matériel et Méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Souche bactérienne

La souche d'*Escherichia coli* MH1 a été utilisée pour amplifier les plasmides. Son génotype est araD139, Δ lacX74, galE, galK, hsr, rpsL.

2.1.2 Lignées cellulaires

Les cellules ainsi que les milieux proviennent du service de culture cellulaire de l'IGBMC. Les cellules de rein embryonnaires humain (HEK293) ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5g/L glucose) w/GLUTAMAX-I +10% sérum fœtal de veau (FCS) + Gentamycine 40 μ g/mL. Les cellules HeLa provenant d'un cancer du col de l'utérus, ont été cultivées dans du DMEM (1 g/L glucose) + 5% FCS + Gentamycine 40 μ g/mL. Les différents milieux utilisés pour la prolifération et la différenciation des cellules hMADS sont détaillés dans la partie 2.7.

2.1.3 Vecteurs plasmidiques

- Vecteurs utilisés contenant le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) :
 - p3XFLAG-CMV_{7.1} HELZ2 α (pBS 5030) et p3XFLAG-CMV_{7.1} HELZ2 β (pBS 5034) obtenus de Takuya TOMARU, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi 371-8511, Japan
 - pCi neo HA-THRAP3 (pBS 5998)
 - pMF-P10-mCherry-pH-3C-TwinStrep fournit par la plateforme de biologie moléculaire de l'IGBMC (pBS 5999)
 - Px330-T2A-GFP fournit par la plateforme de biologie moléculaire de l'IGBMC (pBS 5530)
- Vecteurs utilisés contenant le gène de résistance à la Kanamycine (Kan^R) :
 - pEGFP-C1 avec l'étiquette Green Fluorescent Protein (GFP) en N-terminal (N-ter) de Clontech[®] (pBS 2185)
 - pEGFP-C1 HELZ2 α (pBS 5988)
 - pEGFP-C1 HELZ2 β (pBS 5528)
 - pEGFP-C1 HELZ2 α RNB mut (D1354N) (pBS 5989)
 - pEGFP-C1 HELZ2 β RNB mut (D1354N) (pBS 5990)
 - pEGFP-C1 HELZ2 β hél mut (DE666-7AA ; DE2360-1AA) (pBS 5991)

- pEGFP-C1 construction 1 (pBS 5992)
- pEGFP-C1 construction 2 (pBS 5993)
- pEGFP-C1 construction 2b (pBS 5994)
- pEGFP-C1 construction 2c (pBS 5995)
- pEGFP-C1 construction 3 (pBS 5996)
- pEGFP-N3 avec l'étiquette GFP en C-terminal (C-ter) Clontech® (pBS 2249)
- pEGFP-N3 HELZ2β (pBS 5997)

2.2 Biologie moléculaire

2.2.1 Clonages

2.2.1.1 Amplification des inserts par réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Tous les oligonucléotides utilisés ont été commandés chez SIGMA-ALDRICH®.

Les séquences codantes de HELZ2α et β ont été amplifiées par PCR à partir de vecteurs p3XFLAG-CMV_{7.1} contenant les ADN complémentaires (ADNc) des deux isoformes et en utilisant la « Phusion Hot Start II DNA Polymerase » de Thermo Scientific™. Les fragments ont ensuite été purifiés après migration sur un gel d'agarose à 1% en utilisant le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » de MACHEREY-NAGEL® en suivant les instructions du fabricant.

2.2.1.2 Digestion

Toutes les digestions ont été faites par les enzymes FastDigest™ de Thermo Scientific™ à 37°C pendant 1 heure en suivant les instructions du fabricant. Les fragments PCR purifiés ont été digérés ainsi que les plasmides receveurs. Les extrémités de ces plasmides ont ensuite été déphosphorylées en utilisant la phosphatase alcaline CIP de New England Biolabs®. Les ADN ont été purifiés sur colonne en utilisant le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » de MACHEREY-NAGEL®.

2.2.1.3 Ligation

Les réactions de ligation ont été réalisées par l'ajout d'un volume de DNA Ligation Kit <Mighty Mix>™ de TAKARA® au mélange vecteur et insert. Une réaction contrôle sans insert a été réalisée en parallèle. Ces réactions ont été incubées à 16°C pendant une nuit.

2.2.1.4 Transformation

Après avoir été décongelées sur de la glace, 100 µL de bactéries MH1 compétentes (congelées et préparées par une personne du laboratoire) ont été ajoutées à la ligation et maintenues 30 min dans la glace. Les bactéries ont ensuite subi un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis ont été replacées pendant 2 min dans la glace. Ensuite, 1 mL de milieu LB a été ajouté et les bactéries sont incubées à 37°C pendant 1 h avant d'être étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar et l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le vecteur (ampicilline à 100µg/mL ou kanamycine à 50µg/mL). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit.

2.2.1.5 Minipréparation d'ADN plasmidique

Les colonies obtenues ont été prélevées à l'aide d'un cône stérile et introduites dans un tube de culture stérile à fond rond et bouchon ventilé contenant 3 mL de LB et l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le vecteur (ampicilline à 100µg/mL ou kanamycine à 50µg/mL). La culture a été incubée au minimum 8 heures à 37°C avec agitation. L'ADN plasmidique a été extrait à partir de 2 mL de culture avec le kit « NucleoSpin® Plasmid EasyPure » de MACHEREY-NAGEL®, en suivant les instructions du fabricant. Le reste des cultures est conservé à 4°C.

2.2.1.6 Contrôle des plasmides

Les plasmides obtenus ont été digérés par des enzymes de restriction sélectionnées et ensuite déposés sur un gel d'agarose 1%, Tris Borate EDTA (TBE) 1X contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET) puis détectés par illumination avec un rayonnement ultraviolets (UV). Les plasmides ayant le profil de digestion attendu ont été envoyés à la société GATC biotech® qui effectue des séquençages par la méthode de Sanger. Les résultats ont été analysés avec le logiciel A Plasmid Editor (APE). Les plasmides comportant la séquence voulue ont été amplifiés et stockés.

2.2.2 Amplification des plasmides

Les restes de cultures utilisées pour les minipréparations d'ADN contenant les plasmides voulus ont servi à inoculer 200 mL de LB contenant l'antibiotique approprié. Après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation, les bactéries ont été culottées et le kit « NucleoBond® Xtra Midi » de MACHEREY-NAGEL® a été utilisé pour purifier l'ADN plasmidique en suivant les instructions du fabricant. La concentration finale

d'ADN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 et ajustée à 1µg/µL.

2.2.3 Mutagenèse par PCR

Afin d'introduire des mutations dans le domaine RNB et les domaines hélicases de HELZ2, deux longs oligonucléotides (40mer) complémentaires et contenant la mutation désirée ont été utilisés pour amplifier, par PCR, la totalité d'un plasmide où l'ADNc de HELZ2 a été préalablement introduit. Dix-huit cycles ont été réalisés avec un temps d'élongation d'une minute par kilobase en utilisant la PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase de Agilent Technologies®. Le produit de la réaction de PCR a été incubé 1h à 37°C en présence de l'enzyme DpnI qui digère les plasmides méthylés sur les sites 5' CA|TC 3' donc uniquement ceux utilisés comme matrice. Un aliquote de ces réactions a été utilisé pour transformer des bactéries MH1 compétentes. Les plasmides résultants ont ensuite été purifiés en utilisant la procédure de minipréparation en partant de colonies isolées puis vérifiés par séquençage. Enfin les plasmides comprenant la séquence voulue sont stockés et amplifiés.

2.2.4 Test T7 endonucléase

L'ADN génomique des cellules HEK293 a été extrait à l'aide du kit DirectPCR Lysis Reagent (Tail) de la société Viagen Biotech en suivant les instructions du fabricant. Une réaction de PCR permettant d'amplifier la région d'intérêt a été réalisée en utilisant avec la PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase de Agilent Technologies®. Le produit de PCR a été chauffé puis renaturé et ensuite digéré par l'endonucléase T7. Les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose, ceci permet de savoir s'il y a eu remaniement de l'ADN génomique (Figure 21).

2.3 Infection des cellules d'insectes par baculovirus

Le bacmide (vecteur pouvant se propager à la fois dans E. coli et les cellules d'insectes) codant pour le génome du Baculovirus ainsi que la protéine 3xFlag-HELZ2β-TwinStrep a été créé par la plateforme de Baculovirus de l'IGBMC par cotransfection d'un plasmide donneur codant pour la protéine HELZ2 étiquetée et d'un bacmide dans les cellules d'insectes. Ensuite des cellules Sf9 ont été infectées avec le virus afin de l'amplifier. Trois jours après infection, les cellules ont été récupérées, lavées avec du Phosphate buffer saline (PBS) puis lysées par sonication dans le tampon de charge, ou à l'aide de différents tampons de lyse.

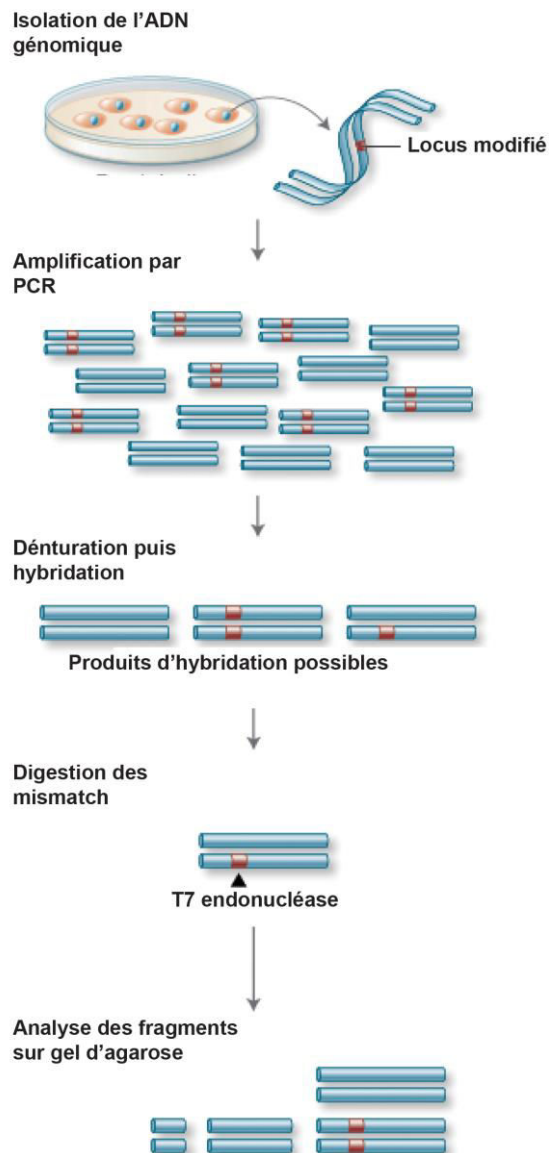


Figure 21 : Schéma du principe de la méthode de l'endonucléase T7 pour évaluer la fraction de locus génomique modifié (d'après <https://www.neb.com/>)

2.4 Test d'activité ribonucléase

2.4.1 Marquage d'oligonucléotides ADN et ARN

Les oligonucléotides synthétiques commerciaux à une concentration finale de 60 μM ont été mis en présence de 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ATP- γ -S et de 2U/ μl T4 Polynucléotide Kinase (ThermoFisher[®]) dans le tampon PNK A (ThermoFisher[®]). Après 30 min d'incubation à 37°C, de la fluorescéine maléimide à une concentration de 6,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a été ajoutée à la réaction. Le tout a été incubé 30 min à 65°C, puis la réaction a été interrompue par ajout d'un volume de Phenol:Chloroform:Isoamyl 25:24:1 (PCI) puis mélangée

vigoureusement pendant 1 min et centrifugée pendant 1 min à 12 000 g. La phase aqueuse a été récupérée, suivi d'une précipitation à l'éthanol qui consiste en l'ajout de 300 mM NaAc pH 5,2, 3 volumes d'éthanol froid 100% et 12,5 ng/μl glycogène. Après précipitation à -20°C sur la nuit, les échantillons ont été centrifugés pendant 30 min à 16 000 g. Le culot d'acide nucléique marqué a été resuspendu dans 30 μl d'eau.

Le 20mer d'ARN utilisé a pour séquence :

5' C.C.U.A.U.A.G.U.G.A.G.U.C.G.U.A.U.U.A.A 3'

Le 35mer d'ADN utilisé a pour séquence :

5' dC.dC.dA.dA.dC.dT.dA.dT.dG.dC.dC.dT.dT.dC.dC.dT.dG.dA.dG.dT.dC.dG.dA.dC.dA.dG.dA.
dG.dC.dC.dC.dT.dC.dT.dC.dC.dA.dC.dC.dT.dG.dC 3'

Oligonucléotides hybrides ADN/ARN utilisés ont pour séquence :

5' dC.dA.dG.dT.dG.dC.dG.dA.dT.dC.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A 3'

5' dC.dA.dG.dT.dG.dC.dG.dA.dT.dC.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C 3'

5' dC.dA.dG.dT.dG.dC.dG.dA.dT.dC.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G.G 3'

5' dC.dA.dG.dT.dG.dC.dG.dA.dT.dC.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U.U 3'

2.4.2 Transfections :

Un jour avant la transfection, 5 millions de cellules humaines en culture ont étéensemencées dans des boîtes de Petri de 10 cm. Les cellules ont étéensemencées de telle sorte qu'elles soient le jour de la transfection à 70-80% de confluence environ. Le jour de la transfection, au moins 30 min avant l'addition de l'ADN, le milieu des cellules a été changé pour du milieu sans antibiotique. Pour les transfections, 5 μg des plasmides pEGFP-C1, pEGFP-C1-HELZ2α ou pEGFP-C1-HELZ2β sauvages ont été utilisés ainsi que plusieurs quantités des plasmides codant pour les protéines mutantes (de 5 à 15μg). Le réactif TurboFect™ de Thermo Fisher Scientific® avec un rapport (masse : volume) ADN : réactif de 1 : 2 a été utilisé. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu avec antibiotique.

2.4.3 Lyse cellulaire

Deux jours après transfection, les cellules ont été récoltées dans du PBS froid puis culotées à 200 g, 5 min, à 4°C. Le PBS est aspiré puis les cellules ont été reprises dans 1 mL de tampon de lyse IPP150+1%NP-40 + cComplete™ EDTA-free Protease

Inhibitor Cocktail 1X de Roche® et incubées 20 min à 4°C. Les débris cellulaires ont été culotés par centrifugation à 14000 rpm, 15 min à 4°C. Le surnageant est récupéré, il constitue l'extrait protéique total.

[2.4.4 Immunoprécipitation des protéines étiquetées](#)

Deux types de billes GFP-Trap® ont été utilisés, des billes d'agarose (GFP-Trap®_A) et des billes magnétiques-agarose (GFP-Trap®_MA) de la société ChromoTek.

[2.4.4.1 GFP-Trap® A](#)

Les billes d'agarose ont été lavées deux fois avec du PBS (centrifugation 1000 rpm, 1 min, 4°C) puis resuspendues dans du tampon de lavage IPP150 + cOmplete™ 1X de Roche®. Les cellules contenues une boîte de Petri de 10cm de diamètre à confluence ont été lysées puis immunoprécipitées avec 25 µL de billes. Une fraction de l'extrait protéique a été conservée comme fraction totale, à laquelle du tampon de charge pour les protéines est ajouté. Le reste est incubé avec les billes GFP-Trap®_A pendant 1h à 4°C avec rotation. Ensuite, les billes ont subi trois lavages avec de l'IPP150 d'une minute avec rotation, puis ont été resuspendues dans du tampon de réaction contenant l'ADN et l'ARN marqués. L'ensemble est incubé à 37°C avec une légère agitation régulière. Aux temps 0, 5, 15, 30 et 60 min, 10% du surnageant a été prélevé sans centrifugation et transféré dans un tube froid contenant du tampon de charge pour les acides nucléiques. A la fin de la cinétique, du tampon de charge pour les protéines a été ajouté au restant des billes, cette fraction étant la fraction des protéines immunoprécipitées (IP). L'ensemble des échantillons a été conservé à -20°C.

[2.4.4.2 GFP-Trap® MA](#)

Le même protocole a été utilisé avec les billes magnétique-agarose mais un aimant a servi aux lavages pour remplacer les étapes de centrifugations. Ceci permet des lavages plus efficaces. Les cellules contenues dans une boîte de Petri de 10cm de diamètre à confluence ont été lysées puis immunoprécipitées avec 10 µL de billes.

[2.4.5 SDS-Page et western-blot](#)

Les protéines ont été dénaturées par une incubation de 3 min à 90°C suivi d'une centrifugation de 2 min à 14000 rpm. Les échantillons ont alors été déposés sur gel d'électrophorèse dénaturant de polyacrylamide à 8% (SDS-PAGE). La migration a été effectuée dans du tampon de migration à l'intérieur d'une cuve Biorad® mini protean II™ à 50 V dans le gel de concentration puis 150 V dans le gel de séparation. Les

protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose Whatman™ de GE Healthcare® dans une cuve Mini Trans-blot® cell de Biorad® dans le tampon de transfert à 4°C, 90 V et pendant 3 h. L'efficacité du transfert a été contrôlée par coloration de la membrane au rouge Ponceau. Ensuite le blocage de la membrane a été effectué pendant 30 min à température ambiante sous agitation dans du PBS-T avec 5% de lait écrémé (Régilait). L'incubation de l'anticorps primaire (Acl) dilué dans le PBS-T+5% lait a été réalisée pendant la nuit, à 4°C sous agitation. La membrane a été lavée 3 fois avec du PBS-T. Ensuite, elle a été incubée 1 h à température ambiante sous agitation avec du lait PBS-T où est dilué l'anticorps secondaire (AclI) couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Après trois lavages au PBS-T puis une incubation de 2 min dans une solution « enhanced chemiluminescence » ECL®, la révélation a été faite par l'appareil ImageQuant LAS 4000™ de GE Healthcare®.

2.4.6 [Gel d'acrylamide-urée](#)

Une échelle de taille a été réalisée par dégradation alcaline des ARN en incubant 3 min à 90°C l'ARN marqué et de l'ARN total de levure dans le tampon d'hydrolyse alcaline. La RNase T1 est une endonucléase qui coupe les brins d'ARN en 3' des résidus guanine. Une autre échelle de taille a été réalisée en incubant 5 min à 50°C l'ARN marqué ainsi que de l'ARN total de levure avec la RNase T1 de Thermo Fisher Scientific® diluée au 1/500^{ème} dans le tampon ΔT1. Les quantifications ont été réalisées avec ImageQuant TL.

Pour détecter les ARN et ADN marqués, ils ont été déposés sur un gel contenant 12% d'acrylamide:bisacrylamide 19:1, 8M d'urée et du tampon TBE 0,5X. La solution du gel a été préalablement filtrée avec une unité de filtration Stericup® de 0,22µm de Merck Millipore®.

La migration a été réalisée dans le tampon TBE 0,5X. Une pré-migration à 20 W pendant 20 min ainsi qu'une plaque métallique maintenue contre les plaques de verre entourant le gel permet de répartir et d'uniformiser la chaleur pour maintenir des conditions dénaturantes. Après dépôt des échantillons préalablement chauffés 5 min à 65°C, la migration a été effectuée à 20 W. La détection de la fluorescéine et donc de la partie 5' des acides nucléiques a été effectuée par l'appareil Typhoon FLA9000™ de Amersham Biosciences®.

2.5 Test d'activité ATPase

Une méthode similaire à celle utilisée pour les tests d'activité nucléase a été utilisée pour tester l'activité ATPase de HELZ2. Seules les étapes qui diffèrent sont décrites ci-dessous.

2.5.1 Immunoprécipitation

Une fraction de l'extrait protéique a été conservée comme fraction totale, à laquelle du tampon de charge pour les protéines est ajouté. Le reste a été incubé avec les billes GFP-Trap®_MA pendant 1 h à 4°C avec rotation. Une immunoprécipitation avec les billes magnétique-agarose GFP-Trap®_MA a été réalisée en ajoutant trois lavages rapides avec le tampon de lavage contenant de l'ATP, cette étape permet de retirer les chaperonnes. Une fraction des billes a été conservée comme fraction immunoprécipitée, à laquelle du tampon de charge pour les protéines a été ajouté. Ensuite, les billes ont été resuspendues dans du tampon de réaction ATPase contenant l'ATP- α -³²P. Les échantillons sont séparés en deux groupes et 10 μ g d'ARN total a été ajouté dans la moitié des échantillons seulement. L'ensemble a été incubé à 37°C avec une légère agitation régulière. Aux temps 0 et 90 min, une fraction du surnageant a été prélevée et transférée dans un tube froid contenant du PCI. Une extraction phénol-chloroforme a été réalisée et la fraction aqueuse a été transférée dans un nouveau tube. Un échantillon où l'ATP- α -³²P a été incubé avec du GDP et de la protéine NDK a été déposé. Cette protéine permet de transférer un phosphate de l'ATP sur le GDP pour le transformer en GTP, ceci nous permet de visualiser l'ADP radioactif. L'ensemble des échantillons est conservé à -20°C.

2.5.2 Chromatographie en couche mince (Thin Layer chromatography (TLC))

Afin d'étudier l'hydrolyse de l'ATP, 2 μ L de chaque échantillon a été déposé à la base d'une couche mince TLC PEI Cellulose F de Merck®. Le bas de la couche mince a été partiellement immergé dans le tampon TLC. Après 1 h de migration, la membrane a été exposée pendant 2 h en contact avec un écran phosphore aussi appelé radio luminescents à mémoire (ERLM). La radioactivité ayant été captée par cet écran aussi appelé plaque de phosphore a été analysé par l'appareil Typhoon FLA9000™ de Amersham Biosciences®.

2.6 Localisation protéique

2.6.1 Transfection de cellules HeLa

Des lamelles de microscopie ont été désinfectées à l'éthanol puis exposées aux rayons UV pendant 15 min. Les cellules HeLa ont été déposées dans les puits de boîtes de culture six puits contenant ces lamelles à une densité de 0,2 millions cellules/mL. Un jour après elles ont été co-transfectées avec 4 µg des plasmides pEGFP-C1-HELZ2 ou pEGFP-N3-HELZ2 et 4 µg du plasmide pCi neo HA-THRAP3. Le réactif TurboFect™ de Thermo Fisher Scientific® avec rapport (masse : volume) ADN : réactif de 1 : 2 a été utilisé. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu avec antibiotique.

2.6.2 Immunofluorescence

Deux jours après transfection, les lamelles ont été récupérées et lavées trois fois au PBS, puis les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10 min. La PFA a été ensuite neutralisée avec de la glycine à 2,5M diluée au 1/20 dans du PBS. Après trois lavages avec du PBS, les cellules ont été perméabilisées par du tampon PBS-Triton 0,1% pendant 15 min. Ensuite, une étape de blocage a été réalisée avec incubation des cellules avec du PBS-BSA 1% pendant 30 min en chambre humide. L'incubation de l'anticorps primaire a été réalisée pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, les lamelles ont été incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire fluorescent (DAM549). Finalement, après lavages les lamelles ont été incubées 30 s dans du DAPI dilué au 1/10000^{ème}. Après trois derniers lavages, une goutte du milieu de montage ProLong® Gold Antifade de Scientific™ a été déposée sur une lame et les lamelles y sont appliquées. Le microscope utilisé est un Leica DM4000 B avec l'objectif HC PL APO 100x/1.40 Oil CS2 qui est un objectif plan apochromatique à immersion d'huile avec un grossissement de 100X et une ouverture numérique de 1.40. Les blocs filtres suivants ont été utilisés : BP 480/40, 505, BP 527/30 pour la GFP ; BP 360/40, 400, BP 470/40 pour le DAPI ; et BP 545/30, 565, BP 610/75 pour le DyLight® 549.

2.7 Différentiations des cellules hMADS

Les cellules hMADS 3 ont été obtenues du service de culture cellulaire de l'IGBMC (provenant du Dr Christian DANI (Institut de Biologie Valrose (iBV), Nice). Elles sont aussi capables de se différencier en adipocytes, en chondrocyte ou en ostéoblaste en

fonction du milieu de culture (Rodriguez et al. 2004). Les différents protocoles de différenciations sont illustrés ci-dessous. Des cellules souches dérivées de tissu adipeux, la lignée hMADS3 (human multipotent adipose-derived stem cells) ont été choisies.

2.7.1 Adipogenèse

Le protocole de différenciation en adipocyte dure 17 jours. Le facteur de croissance FGF2, nécessaire pour la prolifération des cellules, est ajouté dans le milieu jusqu'à un jour après confluence, puis le FGF2 est retiré pendant 24h. La différenciation est donc initiée deux jours après confluence. Cette différenciation est induite à l'aide d'un cocktail comprenant de l'insuline, l'hormone thyroïdienne T3, de l'apotrannsferrine, de la rosiglitazone (agoniste de PPAR γ), de la dexaméthasone et de l'IBMX (activateur de la voie de la protéine kinase A (PKA)) pendant trois jours. Ensuite la dexaméthasone et l'IBMX sont omis du milieu jusqu'à la différenciation complète soit onze jours supplémentaires (Figure 22) (Elabd et al. 2009; Pisani et al. 2011).

Après induction de la différenciation, les cellules ont été fixées comme décrits précédemment, puis un marquage des lipides à l'Oil Red O (SIGMA-ALDRICH®; Réf : O0625-25G) à plusieurs stades a permis de suivre son évolution. Deux lavages avec du Propanol-2 à 60 % ont été réalisés suivi d'une incubation avec Oil red O-solution 60% 10 minutes. Ensuite, les cellules ont été lavées une fois au Propanol-2 60 % suivi de lavages à l'eau distillée 20 secondes jusqu'à ce que l'eau soit claire.

Des photos ont été prises ainsi que des images avec un microscope optique inversé. Ensuite, le colorant a été extrait des cellules après leur lyse à l'aide d'isopropanol avec 4% de NP40. L'absorbance (DO) a été mesurée à 492nm. Des cellules ont été prélevées à différents temps puis lysées pour étudier le devenir de HELZ2.

2.7.2 Ostéogénèse

Le cocktail de différenciation de l'acide ascorbique, du β -glycérophosphate, de la vitamine D3 et de la dexaméthasone (Rotger et al. 2011) (Figure 23).

Après induction de la différenciation, les cellules ont été fixées comme décrits précédemment, suivi d'un marquage à l'Alizarin red colorant les dépôts calciques en rouge afin de contrôler la différenciation. Deux lavages à l'eau distillée ont été réalisés suivi d'une incubation avec de l'Alizarin red 2% pendant 30 minutes dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées 4 fois à l'eau distillée.

Des photos ont été prises ainsi que des images avec un microscope optique inversé. Des cellules ont été prélevées à différents temps puis lysées pour étudier le devenir de HELZ2.

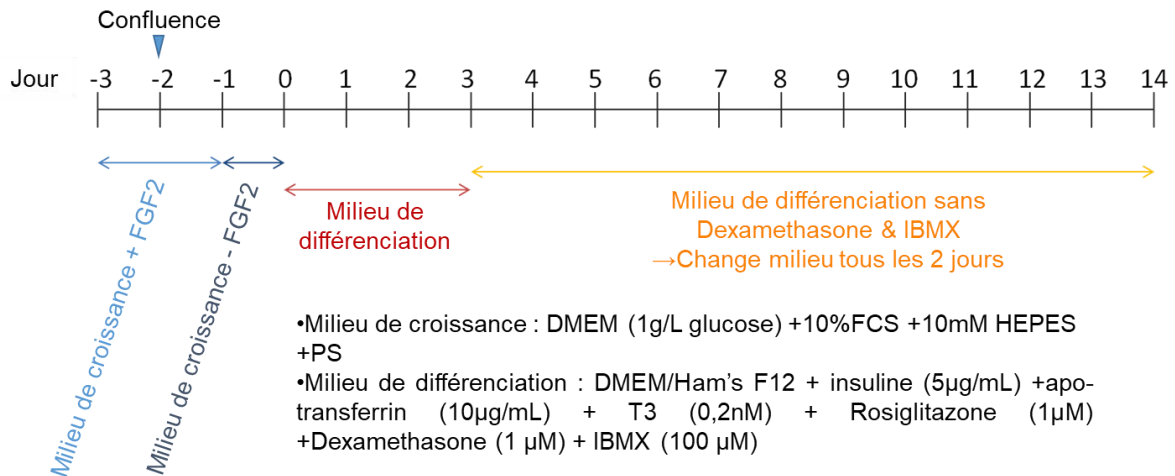


Figure 22 : Protocole de différenciation des cellules hMADS en adipocytes

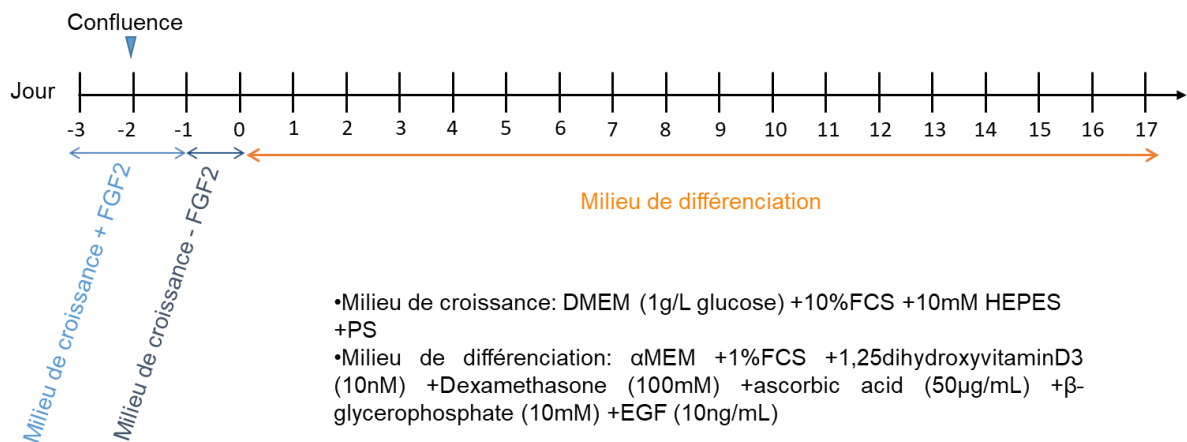


Figure 23 : Protocole de différenciation des cellules hMADS en ostéoblastes

2.7.3 Chondrogenèse

Pour la chondrogenèse, le début du protocole est également le même. Le cocktail de différenciation contient de l'acide ascorbique, de l'insuline, de l'apo-transferrine, du sélénium, du sodium pyruvate, de la proline, de la dexaméthasone et du TGF-β3 (Roux et al. 2013) (Figure 24).

Après induction de la différenciation, les cellules ont été fixées comme décrit précédemment, suivi d'un marquage au bleu Alcian qui permet de contrôler la différenciation en colorant les polysaccharides sécrétés par les chondrocytes. Deux lavages à l'eau distillée ont été réalisés suivi de deux lavages avec du HCl 0,1N. Ensuite, une incubation avec du bleu Alcian 1% a été réalisé pendant la nuit à 4°C dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois au HCl 0,1N, et deux fois à l'eau distillée.

Des photos ont été prises ainsi que des images avec un microscope optique inversé. Des cellules ont été prélevées à différents temps puis lysées pour étudier le devenir de HELZ2.

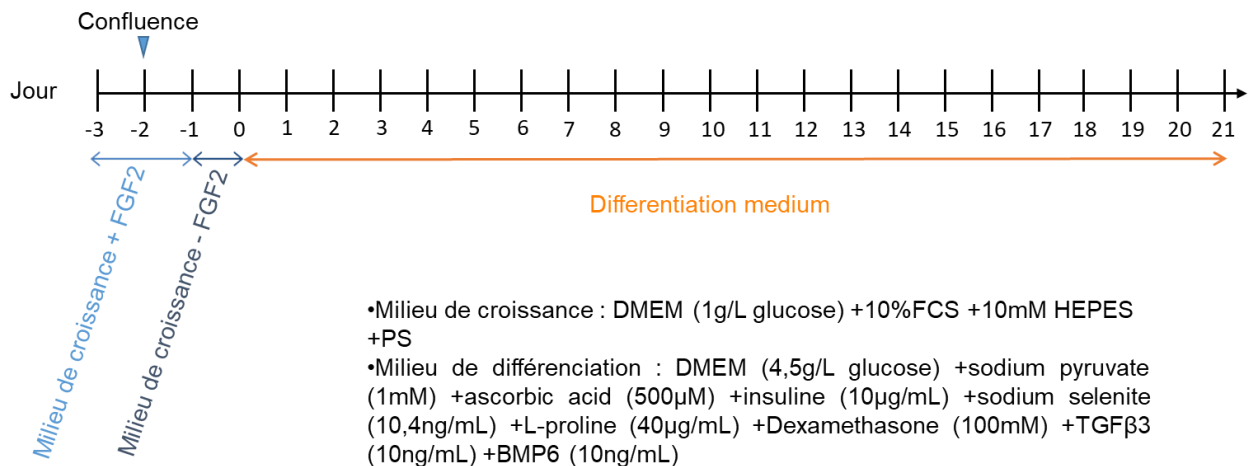


Figure 24 : Protocole de différenciation des cellules hMADS en chondrocytes

2.8 Identifications de partenaires protéiques

Une purification à grande échelle des protéines GFP, GFP-HELZ2α et β a été réalisée avec les billes GFP-Trap_MA. Les lavages ont été optimisés : 3 lavages de 3 minutes avec rotation à 4°C. Les échantillons ont été déposés sur un gel gradient d'acrylamide 5-20% puis coloré à l'argent avec le SilverQuest™ Silver Staining Kit de Thermo Fisher Scientific®.

2.9 Solutions utilisées

ECL : 0.1M Tris pH8.5 ; 0.67 mM coumaric acid ; 1.25 mM Luminol ; 0.01% H₂O₂

Gel de concentration : 0.062M Tris pH6.8, acrylamide 5%, SDS 0.1%, APS 0.1%, TEMED 0.01%

Gel de séparation : 0.375M Tris pH8.8, acrylamide 8%, SDS 0.1%, APS 0.1%, TEMED 0.03%

IPP150 :10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 150 mM NaCl; 0.1% NP-40 ; 1mM DTT

IPP150 + 1%NP-40 : 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 150 mM NaCl; 1% NP-40 ; 1mM DTT

IPP500 :10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 500 mM NaCl; 0.1% NP-40 ; 1mM DTT

IPP500 + 1%NP-40 : 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 500 mM NaCl; 1% NP-40 ; 1mM DTT

PBS : 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄ ; 1,76 mM KH₂PO₄

PBS-T : PBS ; 0,3% Tween20

RIPA : 50 mM Tris, pH 8.0 ; 150 mM NaCl ; 1.0% NP-40 ; 0.5% sodium deoxycholate ; 0.1% SDS

Tampon d'hydrolyse alcaline : 0,1 M NaCO₃ pH9

Tampon de charge pour acides nucléiques : 92% formamide ; 0,25% SDS ; 1mM EDTA pH8 ; Tris pH 7,56 0,1M

Tampon de charge protéique 3X : 0,05% bleu de bromophénol (BBP) ; 50 mM Tris pH 6.8 ; 10% glycérol ; 2% SDS

Tampon de lavage avec ATP : 10 mM Tris, pH 8.0 ; 10 mM MgCl₂ ; 5 mM ATP ; 150 mM KCl

Tampon de migration de SDS-PAGE : 50mM Tris ; 0,5M glycine ; 0,1% SDS

Tampon de réaction essais ATPase : 10mM Tris-HCl pH8 ; 150mM NaCl ; 0,1mM MgCl₂ ; 1mM DTT

Tampon de réaction essais nucléase : 20 mM HEPES pH7 ; 150 mM NaCl ; 1.5mM MgCl₂ ; 5mMHCl ; 1mM DTT

Tampon de transfert : 50mM Tris ; 0,38M glycine ; 20% EtOH ; 0.1% SDS

Tampon TLC : 0.75M KH₂PO₄ pH3,4

Tampon ΔT1 : 20 mM citrate de sodium pH4,5 ; 1 mM EDTA ; 7M urée

TBE : 89mM Tris ; 89mM acide borique ; 2mM acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)

2.10 Anticorps

Anticorps primaires :

- Anti-actine : ACT-2D7 de la plateforme de production d'anticorps de l'IGBMC, monoclonal de souris, dilué au 1/5000^{ème}
- Anti-flag : FLAG-M2 de SIGMA-ALDRICH®, monoclonal de souris, dilué au 1/250^{ème} pour les IF et 1/5000^{ème} pour les western blot
- Anti-GFP : JL-8 de Clontech®, monoclonal de souris, dilué au 1/1000^{ème}
- Anti-HA : HA1.1 de BioLegend®, monoclonal de souris, dilué au 1/250^{ème}
- Anti-HELZ2 : orb126276 de Biorbyt®, polyclonal de lapin, dilué au 1/1000^{ème}
- Anti-Ppar- γ : PPAR γ -1H4 de la plateforme de production d'anticorps de l'IGBMC, monoclonal de souris, dilué au 1/1000^{ème}
- Anti-streptavidine : orb323064 Biorbyt®, monoclonal de souris, dilué au 1/50^{ème} pour les IF et 1/1000^{ème} pour les western blot
- Anti-tubuline : TUB-2A2 de la plateforme de production d'anticorps de l'IGBMC, monoclonal de souris, dilué au 1/5000^{ème}

Anticorps secondaires :

- DAM549 : anticorps d'âne anti-souris couplé au fluorochrome DyLight® 549 dilué au 1/250^{ème}
- GAM-PO : anticorps de chèvre anti-souris couplé à la HRP, dilué au 1/5000^{ème}
- GAR-PO : anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la HRP, dilué au 1/5000^{ème}

2.11 Listes des oligonucléotides utilisés

2.11.1 Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de HELZ2

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de HELZ2

Nom	Fonction	Séquence
OBS6731	Séquençage HELZ2 1	ATG AGC TCC TCC CCC TCC C
OBS6732	Séquençage HELZ2 2	CCG CGC CCA GTC CCA GCT G
OBS6733	Séquençage HELZ2 3	AGG GAT CCA GCC CGC CCC TG
OBS6734	Séquençage HELZ2 4	CAG GTT CCT GGA GCG GCA G
OBS6735	Séquençage HELZ2 5	TGC GGG AGG GGG AGG AGC TC
OBS6744	Séquençage HELZ2 6	GGC GTG GAG CGG ACG GCC GAG
OBS6745	Séquençage HELZ2 7	GGC CCG TGA GCT CAG GGT GCC G
OBS6746	Séquençage HELZ2 8	ACC AAG CAG CTG ACC CTG GGG

2.11.2 Oligonucléotides utilisés pour les mutagénèses par PCR

F : Forward ; R : Reverse

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés pour les mutagénèses par PCR

Nom	Fonction	Séquence
OBS6492	mutation RNB D1354N HELZ2 F	GGG CGC CTG CAA CCT CAA TGA TGC CCT CAG TGT C
OBS6493	mutation RNB D1354N HELZZ2 R	GAC ACT GAG GGC ATC ATT GAG GTT GCA GGC GCC C
OBS7454	Mutation hélicase 1 F	CCC ACA TTC TCA TCG CTG CGG CGG CCC AGA TGC TG
OBS7455	Mutation hélicase 1 R	CAG CAT CTG GGC CGC CGC AGC GAT GAG AAT GTG GG
OBS7456	Mutation hélicase 2 F	GGC AGA TCC TTG TTG CCG CGG CAG GCA TGG CCA CG
OBS7457	Mutation hélicase 2 R	CGT GGC CAT GCC TGC CGC GGC AAC AAG GAT CTG CC

2.11.3 Oligonucléotides utilisés pour les différents clonages de HELZ2

Tableau 3 : Oligonucléotides utilisés pour les différents clonages de HELZ2

Nom	Fonction	Séquence
OBS6488	HELZ2 β F EcoRI	CTT CGG AAT TCG GGG AGG ACG GGC TGC TGG ACA CC
OBS6490	HELZ2 α R EcoRI	CTT CGG AAT TCG GCA TCG TCC GGG AGG TGC TGC C
OBS6715	HELZ2 XbaI F	CTC GAG TCT AGA AGC TCC TCC CCC TCC CGC AG
OBS6716	HELZ2 NotI R	CTC TAG GCG GCC GCT CAG GAA GGC ATA GTT GGC C
OBS6773	Introduction HELZ2 α Sall F	CCA ACT ATG CCT TCC TGA GTC GAC AGA GCC CTC TCC ACC TGC
OBS6774	Introduction HELZ2 α Sall R	GCA GGT GGA GAG GGC TCT GTC GAC TCA GGA AGG CAT AGT TGG
OBS6819	EcoRI HELZ2 α F	GCT TCG AAT TCT ATG AGC TCC TCC CCC TC
OBS6820	HELZ2 α Sall R	GTA CCG TCG ACT CAG GAA GGC ATA GTT GG
OBS6945	HELZ2 β EcoRI F	CTT CTG AAT TCT TAT GGC TGT GTG GGA GGC C
OBS6946	HELZ2 β Sall R NO STOP	CTT CTG TCG ACA ATG GAA GGC ATA GTT GGC CTC
OBS6998	HELZ2 β XbaI F	CTC GAG TCT AGA ATG GCT GTG TGG GAG GCC
OBS7570	introduction EcoRI 3xflag HELZ2 β F	GTG AAC CGT CAG AAT TCA CCA TGG ACT ACA AAG ACC
OBS7571	Introduction EcoRI p3xflag HELZ2 β R	GGT CTT TGT AGT CCA TGG TGA ATT CTG ACG GTT CAC
OBS7674	HELZ2 no stop XbaI	GAT TCT AGA ACC GGA AGG CAT AGT TGG C
OBS7691	oligo F TwinStrep	GGA GGC CAA CTA TGC CTT CC
OBS7692	oligo R TwinStrep + homologie	CAG GTG GAG AGG GCT CTT CAT TTC TCA AAC TGA GGG TGG C
OBS7711	Construction 1 mutagenèse à partir HELZ2 β F	GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTC TGG TGG TGC CCG ACT TGC C
OBS7712	Construction 1 mutagenèse à partir HELZ2 β R	GGC AAG TCG GGC ACC ACC AGA GAA TTC GAA GCT TGA GCT C
OBS7713	Construction 2 mutagenèse à partir HELZ2 β F	GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CTG CGC TAC GGA AGC TGC T
OBS7714	Construction 2 mutagenèse à partir HELZ2 β R	AGC AGC TTC CGT AGC GCA GCA GAA TTC GAA GCT TGA GCT C

OBS7715	Délétion pour construction 2b à partir de C2 F	GCT TCC GGC TGC TCT TCC CCC CCA GCA GGT TCC TGG AGC G
OBS7716	Délétion pour construction 2b à partir de C2 R	CGC TCC AGG AAC CTG CTG GGG GGG AAG AGC AGC CGG AAG C
OBS7717	Construction 3 à partir C2 F	CCC AGC AGG TTC CTG GAG CGT GAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC C
OBS7718	Construction 3 à partir C2 R	GGG CCC GCG GTA CCG TCG ACT CAC GCT CCA GGA ACC TGC TGG G

2.11.4 Oligonucléotides utilisés pour le CRISPR/Cas9

Les ARN guides sont produits par hybridation d'une paire d'oligonucléotides puis introduits dans un plasmide digéré par BbsI.

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour le CRISPR/Cas9

Nom	Fonction	Séquence
OBS7589	Génotypage F 1 ^{er} exon commun	GGCACCGTGGGAAACGACAC
OBS7590	Génotypage R 1 ^{er} exon commun	GGTGTTCCTGAAGCCCTCC
OBS7246	sgRNA A F 1 ^{er} exon commun	CAC CGG CGG AAA GCC TGG CGG TCG T
OBS7247	sgRNA A R 1 ^{er} exon commun	AAA CAC GAC CGC CAG GCT TTC CGC C
OBS7248	sgRNA B F 1 ^{er} exon commun	CAC CGC CCG CCC ACA CGG GCA GAG C
OBS7249	sgRNA B R 1 ^{er} exon commun	AAA CGC TCT GCC CGT GTG GGC GGG C
OBS7250	sgRNA C F 1 ^{er} exon commun	CAC CGG CTG GCG CGG CAC CGC GTG G
OBS7251	sgRNA C R 1 ^{er} exon commun	AAA CCC ACG CGG TGC CGC GCC AGC C
OBS7675	sgRNA D F 1 ^{er} exon commun	CAC CGA GTT CTC GTG GAA GAC CAG G
OBS7681	sgRNA D R 1 ^{er} exon commun	AAA CCC TGG TCT TCC ACG AGA ACT C
OBS7676	sgRNA E F 1 ^{er} exon commun	CAC CGG CTG GCG CGG CAC CGC GTG G
OBS7682	sgRNA E R 1 ^{er} exon commun	AAA CCC ACG CGG TGC CGC GCC AGC C
OBS7677	sgRNA F F 1 ^{er} exon commun	CAC CGG GTC GCC CGC CAG CAC GAG G
OBS7683	sgRNA F R 1 ^{er} exon commun	AAA CCC TCG TGC TGG CGG GCG ACC C
OBS7678	sgRNA G F 1 ^{er} exon commun	CAC CGG TGC GAG GCA TAG GCC AGC G
OBS7684	sgRNA G R 1 ^{er} exon commun	AAA CCG CTG GCC TAT GCC TCG CAC C
OBS7679	sgRNA H F 1 ^{er} exon commun	CAC CGA GAG CTG GCG CGG CAC CGC G
OBS7685	sgRNA H R 1 ^{er} exon commun	AAA CCG CGG TGC CGC GCC AGC TCT C
OBS7680	sgRNA I F 1 ^{er} exon commun	CAC CGT GGG CGG GCG GAA AGC CTG G
OBS7686	sgRNA I R 1 ^{er} exon commun	AAA CCC AGG CTT TCC GCC CGC CCA C
OBS7703	sgRNA 1 F 2 ^{ème} exon commun	CAC CGA CCT AGG CCA GGT GTC TGT
OBS7704	sgRNA 1 R 2 ^{ème} exon commun	AAA CAC AGA CAC CTG GCC TAG GTC
OBS7705	sgRNA 2 F intron1	CAC CGA GCC ACC CGG GGT ATC CTG
OBS7706	sgRNA 2 R intron1	AAA CCA GGA TAC CCC GGG TGG CTC
OBS7707	sgRNA 3 F intron2	CAC CGA TGA GCG CAG GAC GCA GTG
OBS7708	sgRNA 3 R intron2	AAA CCA CTG CGT CCT GCG CTC ATC
OBS7709	Génotypage F 2 ^{ème} exon commun	CGA GCA GAG GTG CAT CTG TG
OBS7710	Génotypage R 2 ^{ème} exon commun	CAC GCA CTC ACG GAT GAA GC

3. Résultats

3 Résultats

3.1 HELZ2 un nouvelle RNase humaine de la famille des RNaseII/RNB ?

3.1.1 Identification d'une nouvelle protéine contenant un domaine RNB potentiel

Par recherche dans les banques de données, une protéine humaine, HELZ2, contenant un domaine RNB a été identifiée. L'analyse de la séquence de cette protéine révèle la présence (Figure 25):

D'un doigt de zinc C2H2, connus pour lier l'ARN double brin ;

D'un doigt de zinc CCCH, connus pour lier l'ARN ;

D'un premier domaine hélicase ;

Du domaine RNB ;

D'un second domaine hélicase.

Les caractéristiques de ces différents domaines sont détaillées ci-dessous. Les données de la littérature indiquent que cette protéine est exprimée sous deux isoformes dénommées β pour la plus longue (2649 acides-aminés) et α pour la plus courte (2080 acides-aminés). Cette dernière version démarre dans le premier domaine hélicase. Les doigts de zinc et le premier domaine hélicase complet ne sont donc présents que dans l'isoforme β .

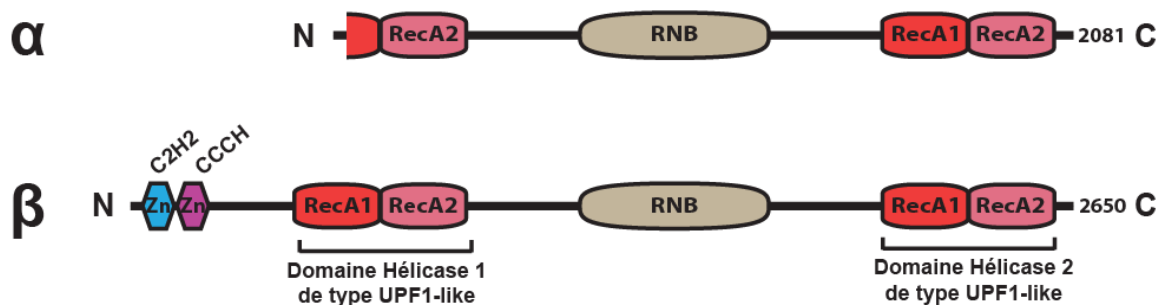


Figure 25 : Représentation schématique de l'organisation des deux isoformes des protéines humaines HELZ2 avec les différents domaines identifiés par similarité de séquences. Les hexagones bleu et violet représentent les doigts de zinc de type C2H2 et CCCH respectivement, les domaines rouge et rose représentent les domaines RecA et RecB des domaines hélicases et l'ovale gris le domaine RNB.

Le second doigt de zinc est de type CCCH. Les séquences de ce type de doigt de zinc sont de longueurs hétérogènes avec des nombres de résidus variable entre les résidus cystéine : Cx5-10Cx4-6Cx3H, la distance canonique étant de 8 résidus entre les deux premières cystéines (Fu et Blackshear 2017). De manière intéressante, la structure de ce doigt de zinc chez HELZ2 a évolué avec une organisation Cx5Cx5Cx3H chez les vertébrés et Cx8Cx11Cx3H chez les mollusques (Figure 27). Ces doigts de zinc ont été décrits comme liant des ARN simple brin.

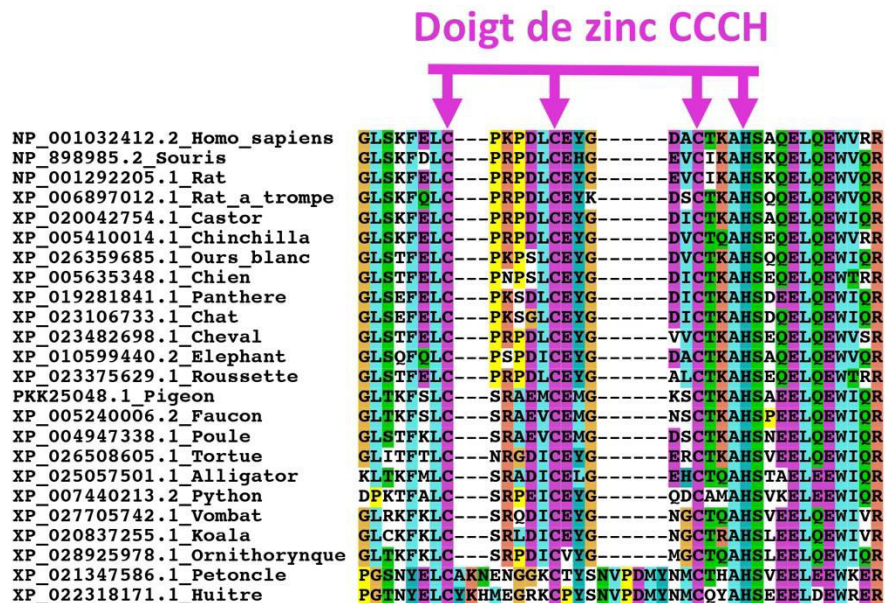


Figure 27 : Séquences du doigt de zinc CCCH de la protéine HELZ2 de diverses espèces. Les résidus cystéines et histidines conservés sont indiqués.

Les domaines hélicases monomériques (par opposition aux protéines hexamériques) ont été groupés en deux grandes familles : SF1 et SF2 (Singleton, Dillingham, et Wigley 2007). Les deux domaines hélicase présents dans HELZ2 sont de type SF1 et appartiennent à la sous-famille Upf1-like (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010). Ce groupe de protéine contient tant des hélicases à ADN telles que DNA2 que des hélicases à ARN telles qu'Upf1 ou Senataxin. Un alignement des 12 domaines hélicases des 11 protéines humaines de cette sous-famille est présenté en Figure 28A. Cet alignement a permis de produire un arbre phylogénétique (Figure 28B) qui montre que les deux domaines hélicases présents dans l'isoforme β de HELZ2 chez l'homme sont assez semblables entre eux. Le premier domaine hélicase est particulièrement similaire à celui de la protéine HELZ (valeur de confiance=1000) qui, comme HELZ2 contient un doigt de zinc suivi d'un domaine hélicase. La structure de la protéine HELZ

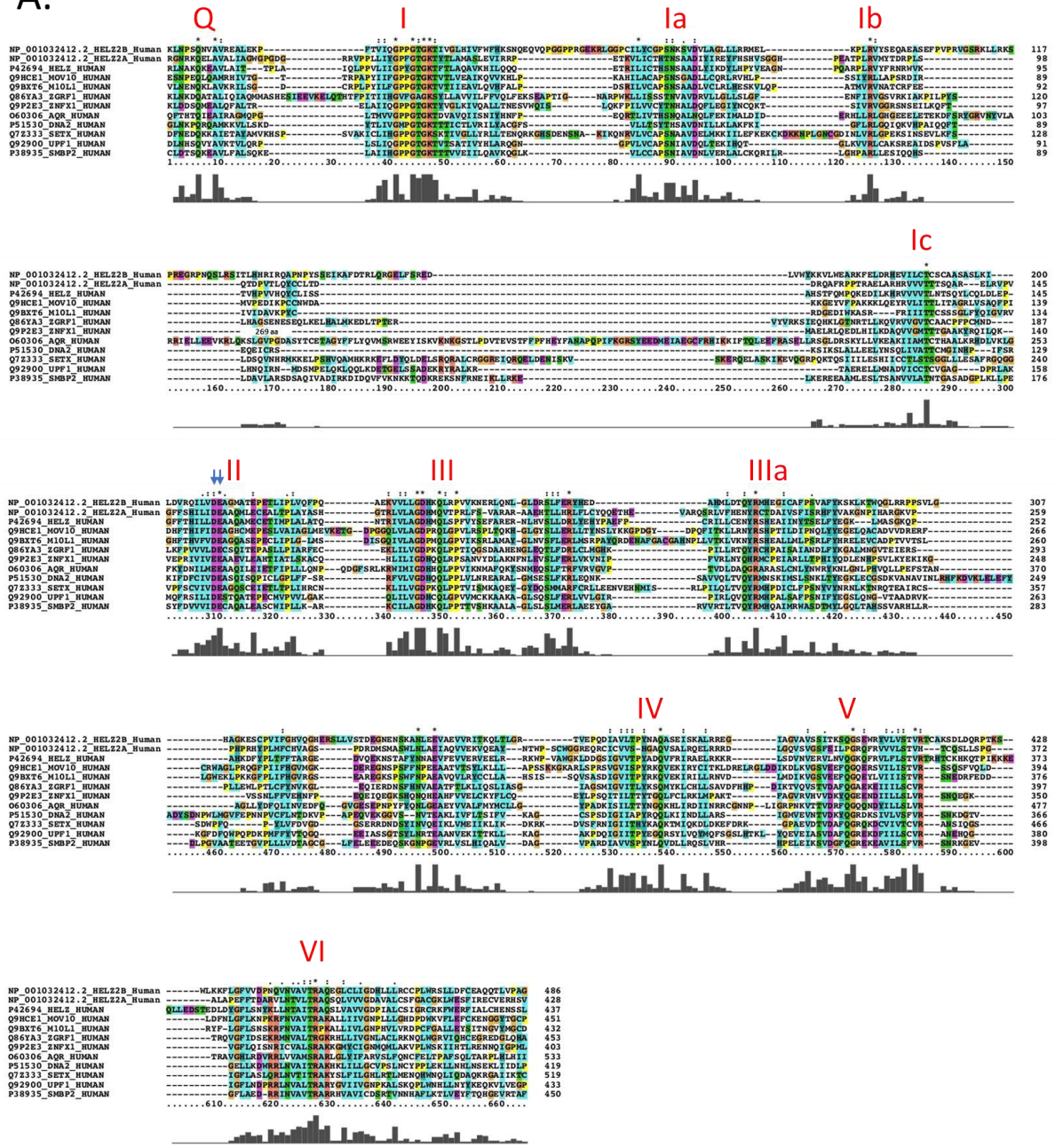
est similaire à celles de la protéine codée par le gène CG9425 de la drosophile mentionnée ci-dessus qui ressemble fortement au premier tiers de HELZ2. L'ensemble de ces protéines pourraient avoir des activités similaires ou redondantes.

Le premier domaine hélicase de HELZ2 et celui de HELZ sont significativement similaires à ceux des protéines MOV10 et MOV10L1. Ces deux facteurs sont impliqués dans le métabolisme des petits ARN non-codant, le premier en tant que membre du complexe RISC, le second de manière analogue pour les piARN dans la lignée germinale male.

Les autres hélicases de cette sous-famille sont moins fortement reliées aux deux domaines hélicases de HELZ2, les valeurs de qualité n'étant pas élevées. La ressemblance avec Upf1 est néanmoins intéressante. En effet, cette dernière protéine contient en amont du domaine hélicases une structure ressemblant à des doigts de zinc et liant trois atomes de ce métal (Kadlec et al. 2006). Ce domaine est impliqué dans l'interaction avec le facteur Upf2. Même si les doigts de zinc sont différents, la similarité d'organisation entre Upf1 et HELZ2, avec une région liant plusieurs atomes de zinc en amont d'un domaine hélicase est suggestive. Elle peut laisser imaginer que chez HELZ2 cette région pourrait non seulement lier des ARN mais aussi des partenaires protéiques.

Un alignement du domaine RNB de HELZ2 avec ceux des 3 autres protéines humaines contenant des domaines RNB (DIS3, DIS3L1 et DIS3L2) ainsi qu'avec la protéine DIS3 de levure est présenté dans la Figure 29. Cet alignement fait ressortir des caractéristiques particulières du domaine RNB de la protéine HELZ2 humaine. On note en particulier l'absence d'un des quatre aspartates conservés du site catalytique des protéines de la famille RNB qui est remplacé chez l'homme par un résidu asparagine (Figure 29). Comme mentionné en introduction, les analyses structurales ont initialement suggéré que les résidus aspartate en position équivalente étaient impliqués dans la coordination d'un ion magnésium du site catalytique (Frazão et al. 2006; Lorentzen et al. 2008). Cette conclusion était néanmoins indirecte car les protéines cristallisées étaient mutées pour un autre résidu aspartique et l'ion magnésium coordonné par ces résidus était uniquement prédit et restait hypothétique. De fait, des études structurales plus récentes suggèrent qu'il pourrait coordonner le résidu 3' du dernier nucléotide de l'ARN substrat (Makino, Baumgärtner, et Conti 2013). Dans tous les cas, la présence d'un résidu asparagine à cette position dans le domaine RNB de HELZ2 questionne si cette protéine est une ribonucléase active.

A.



B.

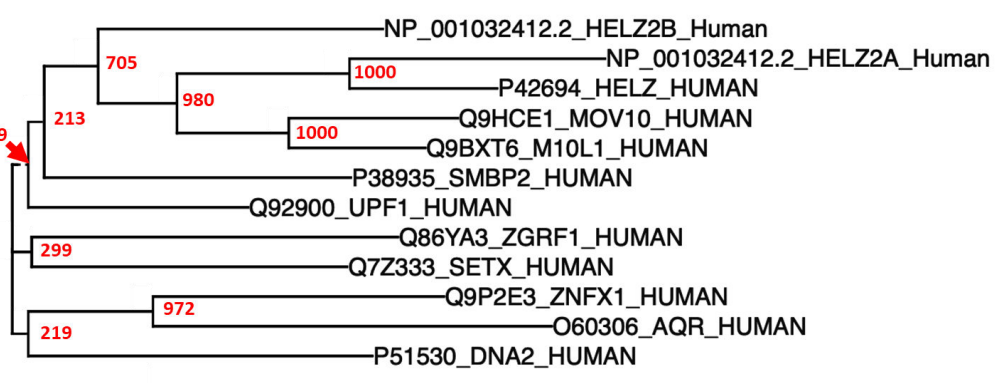


Figure 28 : (A) Alignement des 12 domaines hélicase humaine de la sous-famille UPF1-like des hélicases monomériques SF1. Les différents motifs conservés chez les hélicases sont indiqués. L'alignement a été obtenu avec ClustalX. Pour la séquence de ZNFX1, 269 acides aminés ont été omis entre les motifs Ib et Ic. Les flèches bleues indiquent les acides aminés responsables de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. (B) Arbre déduit de l'alignement présenté dans la partie A. L'arbre a été généré avec ClustalX en éliminant les positions avec des « trous » et en corrigeant pour les substitutions multiples. L'arbre a été dessiné avec « Treeview » en ligne (<http://etetoolkit.org/treeview/>) et les valeurs de confiance de chaque division binaire, basées sur 1000 répétitions, ont été reportées en rouge.

A ce propos, il est intéressant de noter que si ces 3 résidus aspartate et le résidu asparagine présents aux positions « catalytiques » de HELZ2 humaine sont conservés chez les mammifères, ces acides-aminés ne sont pas conservés chez les invertébrés (voir annexe 1). Le résidu asparagine est absent et un seul des 3 résidus aspartate est présent chez le pétoncle. Chez l'huître, aucun de ces acides-aminés n'est présent. Ces observations suggèrent que la protéine HELZ2 des mollusques n'a pas (ou plus) d'activité nucléase. La conservation de ce domaine pourrait alors être due à son importance pour le repliement de la protéine ou parce que même avec ces substitutions, cette protéine conserve une activité comme la possibilité de lier l'ARN.

De plus les domaines de liaison à l'ADN, CSD et S1 présents dans tous les membres de la famille RNaseII/RNB ne sont pas présents dans la séquence de HELZ2 (Figure 19).

3.1.2 [Fonctions de HELZ2](#)

Chez l'Homme, le gène HELZ2 est présent proche du télomère du bras long du chromosome 20, plus précisément sur la bande 20q13.33.

HELZ2 a été identifié pour la première fois en 2002 par spectrométrie de masse dans un extrait nucléaire de foie de rat (Surapureddi et al. 2002). Cette protéine a alors été identifiée comme faisant partie du complexe PPAR α -interacting cofactor (PRIC) et a été nommée PRIC285 en référence à son poids moléculaire estimé à ce moment. Dans cet article l'ADNc a été décrit pour la première fois, il est constitué de 6240 nucléotides et de 18 exons. Un domaine hélicase potentiel est aussi identifié à l'extrémité C-terminale de la protéine. Surapureddi et ses collaborateurs ont démontré une interaction *in vitro* de cette protéine avec plusieurs récepteurs nucléaires dont PPAR α avec qui il est co-localisé dans le noyau. Ils ont aussi montré que PRIC285 était capable de co-activer PPAR α lorsqu'il se fixe sur une séquence d'ADN appelée «élément de réponse aux PPAR» (PPRE).

09Y2L1_RRP44_HUMAN EGIPTAFCCEVYKSLTANPDLIPLAAGLSENGEIEISG---KIIPSEHLPLSKLQGIKSGVTLGGTFRASRE-----NYLNAVHIGDNEKKEIILQGLKHLNRAVHEIVAVELLPKRSQVVA PSSVVLHND---60
D1S3_S.cecevisiae SNITTSKLVGVYELLPNADIDRSDIPLQMSDFDRIKDFSPFPTPEVYSAAVMGILNGVLAGNVLQIQLSEY-----NLEIQQSUSLP---RFRKPLVLYGQKLNLMARNGQVYVELLPQSEMKAPSSIVLASEHFWVNRPIIEIGG 142
08TF46_D13L1_HUMAN FVITFKNTLDFRFDLKAHHECDLILGSR--EENISQSEHKEPELELPLEYLAGISGNYIQGIILNVRKRAQLEAVRLOQAASSKSDVLDLIIHGKARRSIHEGVVVELLPKNGKRRVVALGEND-----CD 137
081YB7_D13L2_HUMAN FELCGHLRF--QSLKSIKSDVAVFAQVPSBSBdg-----GQIQNVLVGVKLLSVC-----VSEKRDGDAPVTKDPTFCISQDTRALSE 85
09BYK8_HELZ2_HUMAN BDFWPMDEGLANADALRELLELDQKQVAVVGVGDLDDVAVRPSLQGARVYELPAPALRKLHAEPERYRHSFVPEFEPKASAIPLDASGGP IGVGRIDCWMAAGPELVVLDLSDGKAPGRRGRVLD---140
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

09Y2L1_RRP44_HUMAN NEEVDYKE-----EETEBRLTKK---NASEKRLKATGQVVGITKRNKRPRVCGDLKSDIK-----EERRLHFPAPAKKRPRIKIEFRQASTLEGRR-----IYVALDGMFRNSRNPNGHFNKLDVQGEKETEVEVILLHNDVPR 256
D1S3_S.cecevisiae DDNNSSSNLTVLSDKQRLKAKDMLTAQKSKKIQTAVVVIQRSSRQIVGOLA-PSSVDPGSSQNVNFTLMKCPVRIKTRKAEMLDKS-----VVRISBMESTVYPNGHVVLDLQITSAQAEFALLHNDVPR 283
08TF46_D13L1_HUMAN KRASGSP-----SSPMFTGVVAVGIIQKNNRDVAVTFPPEKEEVOGQKNAQKILVPMHRYRTPKRISSLQDAETLQDFR-----VAVRISBMESTVYPNGHVVLDLQITSAQAEFALLHNDVPR 255
081YB7_D13L2_HUMAN VIKKREHSLAFVCRMDTMDPRIMVINGSVKIFVAVELDPSQVYISLRKGRLOEYVGERLTAARSRSLV-----FMVOIYVMRQGFYYPGLIVREVLREASTMROGIRIIGLEYSIRV 203
09BYK8_HELZ2_HUMAN160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

09Y2L1_RRP44_HUMAN QPFSQAVLISFLP-----KPPMSITEKDMKN-----KEDLH-HICIGSVPPGCTVYIDBALHCELENGLVEGVHIAVSHFRPGALDADQASARRGVTVLCEKR-IDMVPPELLSSNLCISKCDVRRFLAFSGIMEMNHN-ALHILKI 390
D1S3_S.cecevisiae RPFSSKRVLECLPAGGDMKAPKPLDDPVAVSKDPLRKRKOLA-DKLICISIPPCCVIIDDALHAKKLKNGMVEGVHIAVSHFRPGALDADQASARRGVTVLCEKR-IDMVPPELLSSNLCISKCDVRRFLAFSGIMEMNHN-ALHILKI 430
08TF46_D13L1_HUMAN IFFSSAQKCEPVPV---EPESPVKVSPSEQR---RDLKSHLAVFSIIPKQCEVDDTISVTLNNGMLVGVHIAVSHFRPGALDADQASARRGVTVLCEKR-IDMVPPELLSSNLCISKCDVRRFLAFSGIMEMNHN-ALHILKI 395
081YB7_D13L2_HUMAN SDFSSVEVLECLPQD---LPTWIPPEFSK---RDLK-KCIFTIIPSTARLDDALSCPLADGKFGVHIAVSHFRPGALDADQASARRGVTVLCEKR-IDMVPPELLSSNLCISKCDVRRFLAFSGIMEMNHN-ALHILKI 338
09BYK8_HELZ2_HUMAN PPSDQATYTKVQLK---YHEHLELGRVAGR---REDCR-AFLFETVAVPQAGCLDDALSVEDLD-PCSEVAVHIEVAVSFPVPGQVLDVARSQGAFAAPGPEVPLPASICQVLSILGPRRLAISLFLTMEKASGQKLSL 386
.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450

09Y2L1_RRP44_HUMAN KTKKSVINRSKASLAVYAAQLRIS-----ANNNDITYSLSLGNLAKKILKRRRI-----EKGALITSSPVEVPHNDSETHDPIDLQTKELRENSSWVEFMIILAN-----ISVAKKIHIEEESHALLRK 505
D1S3_S.cecevisiae NPMKSVINRSRAFAVEQAQRLRID-----KQNDDELTKGNRALKIKLSVKQKRR-----EGALINLSPVAVKHNDSETHDPIDLQTKELRENSSWVEFMIILAN-----ISVAKKIHIEEESHALLRK 545
08TF46_D13L1_HUMAN WGGRIIRSAVKLPEYAAQELLDGNSLVVDIIPFKDLDKSKSQAKLEELVWALGKLDIARHVAKRD-----GGALIEEGVEVCGOLD-DKNIHDLIKQPLVHEVVAECMIILAN-----HWAKKIVESPHOALLRO 528
081YB7_D13L2_HUMAN WGGRIIRSCCKLSYEHASQMSLSEPKRIP---AKELRPISEBSSEVHOAVAINHGIAKQLRQDR-----VDGALRDLQKLAFTLIDHREGLPQDCHYERSESKKIVSEFMILAN-----NAVAKIIRAPRPOALLRH 468
09BYK8_HELZ2_HUMAN RAPSIVQSDPQQLSYEAHAEVIRQHPGAGR---ELPALSVDADCVVAALGYSRLRHRHRSKCFEGRDGTGFRALHIVKVMYTOPRVLVAEELVGS ECTRVPVPLNORPAPRPSGQKALCKEKRGRDPRPSLHGH 525
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600

09Y2L1_RRP44_HUMAN HAPPPSNVEILVVAARSR-NLEIKRMDAKSLASISLQAESEPTFPYLN---TLRIRLIVRQGMQAVVFCSGMDN---DPHRYGLASPIYRHFNSP IRRVAVIVRKLAAVAGADCTYPELR---DKHKLADIGKLNIFRHKKAQVAVORAS 646
D1S3_S.cecevisiae HAAPPSTMFELINMKTENKNSISLESKALASLIRCVDPDPPVFN---TLVRIHSTRCMAAOVFPYSGAASY-PDRHRYGLAVDIYRHFNSP IRRVAVIVRKLAAVAGADCTYPELR---DKHKLADIGKLNIFRHKKAQVAVORAS 689
08TF46_D13L1_HUMAN HPPVQGFSPFLRCAKAK-GPFIPIRNRKTLASLNNANDPDPVFN---RLISMAIQMANSNAILFSPGSGAM-EFHHNGALDLYRHFNSP IRRVAVIVRKLAAVAGADCTYPELR---DKHKLADIGKLNIFRHKKAQVAVORAS 674
081YB7_D13L2_HUMAN HPPVQTRSLSLVFCQDM-GLVDPSSAGLNSLTVQTFQDPAKSLAKKEVLYNCSRPQVALFPCGGLQDPAQGRHIALVPLYYRHFNSP IRRVAVIVRKLAAVAGADCTYPELR---DKHKLADIGKLNIFRHKKAQVAVORAS 612
09BYK8_HELZ2_HUMAN HMGGGGSPPTRLHHLASLIMQVQVAPKATQDYKQWVDVLTQDMPLAPAGVDRKKAERSAFRCARGHQD---QGGHYSLVQVYVWAVSP IRRVAVIVRKLAAVAGADCTYPELR---DKHKLADIGKLNIFRHKKAQVAVORAS 667
.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720.....730.....740.....750

09Y2L1_RRP44_HUMAN VAFHQLFVFKSKGIVSRE-----AYTLFVRKNAVAVIIPRYG-----LEGTFVEERKQ-----KPNVQLIYDDEIPLIKTEDEVFNVFQKVVKIMDSSNLDHQK-----IKMSLVEFQIFGISEIPTDT 756
D1S3_S.cecevisiae IXYVGVQVWRNN-ESTFT---GVYIKFNGVNGVILVPIRFG-----VEGLIRLDN-----VYVFDVVEVQV--- 775
08TF46_D13L1_HUMAN TELFOCMVFKKDKDPALEERISISGVYKIRNGVILVPIRFG-----IKGAAVYKMGDGLVISCDDSCSMKSGISLQRQNKIISTEDSEVTFILFPHVTVRISIQASCHSDTRLEIISNPKYIIPTEILIBOSSPLKSE 815
081YB7_D13L2_HUMAN TSLFPAVAVKESGPLESE---ANVMGILKQADFVAVLYYG-----VQKRIYKNAIAR---SHFPQVGRKPELILVWEPEDQEPQOQVYRISLVEVVLQAESE---ALKYSALIKRPGQGHIG 726
09BYK8_HELZ2_HUMAN RSHLAVOLKQKQPKDKTG---FVVDVVEGSRCEKRLFPNRRITLDP-PPVAVYSGLOAEHPALMGRGLMLLRREVVYSAQSSSPPLPLGTVPDDHTAVLTAIMKOLLELVLDQRPBAAALQOEGEGESORRELVVQVORSHCHGF 813
.....760.....770.....780.....790.....800.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900

09Y2L1_RRP44_HUMAN SNNDLNGLPKRKKKRLK 773
D1S3_S.cecevisiae SVNDITSKRAEILK 792
08TF46_D13L1_HUMAN LVREYTKVVEAQAQAE 832
081YB7_D13L2_HUMAN PEKEEESDGGPDESSST 743
09BYK8_HELZ2_HUMAN LEVARELDSGDELTQVQL 830
.....910.....

Figure 29 : Alignement des domaines RNB des protéines humaines DIS3, DIS3L, DIS3L2 et HELZ2 ainsi que de la protéine DIS3 de levure. Les 4 résidus conservés du site catalytique sont indiqués avec des flèches. Ces positions sont occupées par des aspartates chez les différents membres de cette famille à l'exception d'une position substituée en asparagine (flèche rouge) chez HELZ2. L'alignement a été obtenu avec ClustalX.

En 2006, une autre équipe a décrit une interaction de HELZ2 avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD=DNA binding domain) du récepteur PPAR γ (Tomaru et al. 2006). La protéine a donc été renommée PDIP-1 pour « PPAR-DBD-interacting-protein 1 ». Par Northern blot, il a été montré que l'ARNm est exprimé de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus humains. Un niveau d'expression plus élevé a été observé dans le cœur, le foie, les muscles squelettiques et le pancréas. Dans ce second article, deux isoformes de cette protéine ont été décrits. L'isoforme α décrit par Surapureddi et al. A été réévalué à 231kDa et un isoforme appelé β qui est plus étendu en son extrémité N-terminale ayant un poids moléculaire de 295kDa.

Par la suite, le Hugo Gene Nomenclature Committee a approuvé le nom HELZ2 comme nom officiel de cette protéine.

En 2013, l'équipe qui a décrit les deux isoformes a démontré une interaction de HELZ2 β avec la protéine THRAP3 (« thyroid hormone receptor-associated protein 3 ») (Katano-Toki et al. 2013). THRAP3 semble interagir avec les deux domaines hélicases de HELZ2. De plus, THRAP3 et HELZ2 améliorent de manière coopérative l'activation de gènes médiée par PPAR γ . Les auteurs ont montré le recrutement de PPAR γ , HELZ2 et THRAP3 sur les PPRE des enhanceurs de gènes essentiels pour la différenciation en adipocytes (Fabp4/aP2 et Adipoq) dans les cellules de souris 3T3-L1. De plus, un knockdown de THRAP3 inhibe la différenciation de ces mêmes cellules en adipocytes.

Cette même équipe a créé des souris Helz2^{-/-}, par recombinaison homologue en remplaçant les six premiers exons par la cassette de résistance à la néomycine. Les contrôles montrent l'absence d'ARNm de Helz2 dans ces souris mais aucun western blot ne montre la disparition de la protéine. Dans cet article, publié en 2014, ces auteurs démontrent que les souris déficientes en HELZ2 sont protégées contre l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses (High Fat Diet). Une augmentation de l'expression de l'ARNm de HELZ2 dans le foie de souris nourrit avec un régime riche en graisse ainsi que dans le foie des patients obèses atteints de

stéatose hépatique non-alcoolique (NASH). Une stéatose est une lésion du foie correspondant à la surcharge de graisse dans le cytoplasme des hépatocytes. Une résistance centrale à la leptine, associée à une augmentation de l'ARNm du récepteur à la leptine dans le foie des souris HELZ2^{-/-} suivant le régime HFD a été décrite. Une baisse de la lipogenèse ainsi qu'une augmentation de l'oxydation des acides gras a été observé dans ces souris. La stéatose hépatique et la résistance à l'insuline sont améliorées chez les souris HELZ2^{-/-} HFD (Yoshino et al. 2014).

Des études ont identifié HELZ2 comme étant un interferon-stimulated gene (ISG) (Schoggins et al. 2011; Zhao et al. 2005). Ces ISG sont des gènes induits par l'interféron. En 2012, une étude démontre une association de HELZ2 avec un locus de maladie auto-immune dans les lymphocytes B (Fairfax et al. 2012). Ces résultats suggèrent que HELZ2 joue un rôle dans le système immunitaire.

En 2013, un crible visant à identifier les gènes requis pour la fonction antiviral de l'IFN- α (appelés les gènes effecteurs de l'interféron (IEGs)) a permis d'identifier 120 gènes parmi lesquels se trouve HELZ2 (Fusco et al. 2013). Les auteurs ont également montré que l'expression exogène de HELZ2 n'a aucun effet antiviral dans les cellules Huh7.5.1 infectées par le virus de l'hépatite C (HCV). En revanche, lorsque l'expression de HELZ2 est diminuée par l'intermédiaire de shARN ou ARNi, les effets antiviraux de l'IFN- α contre ce virus sont réduits.

En 2017, la même équipe publie une seconde étude montrant que les deux isoformes de HELZ2 sont induits par l'IFN- α dans les cellules Huh7.5.1. Cette induction est responsable d'une inhibition de l'infection par le virus de la Dengue. De plus, la fraction nucléaire de HELZ2 semble augmenter lors d'une induction par l'IFN- α (Fusco et al. 2017). Il est aussi démontré que lorsque HELZ2 est inhibé par ARNi, le taux de plusieurs triglycérides est réduit dans les cellules Huh7.5.1. L'interaction entre HELZ2 et le récepteur nucléaire aux hydrocarbures aromatiques (AHR) serait responsable des effets démontrés dans la réponse immunitaire ainsi que dans la régulation du métabolisme lipidique (Fusco et al. 2017).

Récemment, il a été montré qu'une simulation d'infection virale, consistant en la transfection d'ARN et d'ADN double brin dans des fibroblastes embryonnaires de souris, induit une surexpression de l'ARNm de HELZ2 (Xie, Liu et Percipalle 2019).

En 2016, une étude de population a relié un variant rare de HELZ2 à une maladie auto-immune du foie appelée cholangite biliaire primitive (P. Li et al. 2016).

En conclusion, peu de données sont disponibles sur HELZ2 dans la littérature, cependant les données disponibles lient cette protéine au métabolisme énergétique ainsi qu'au système immunitaire et plus particulièrement la défense contre les infections virales. On note aussi qu'aucune donnée n'est disponible sur les caractéristiques biochimiques des différents domaines identifiés dans HELZ2.

3.2 Caractérisation biochimique de HELZ2

3.2.1 Production de la protéine recombinante dans les cellules d'insectes

Afin d'étudier les propriétés biochimiques de la protéine HELZ2, la production de la protéine recombinante a été entreprise. Due à la taille importante de cette protéine (295kDa pour l'isoforme β), la production bactérienne était très risquée. Par conséquent, la méthode de production en cellules d'insectes avec le système vecteur d'expression baculovirus a été choisie. Une séquence codant pour trois étiquettes Flag suivis d'un site de clivage entérokinase (EK) a été ajoutée en 5' de la séquence codante de la plus grande isoforme, à savoir l'isoforme β . L'ensemble de la séquence a été incorporée dans un plasmide pMF-p10-mCherry-pH-3C-TwinStrep qui permet d'ajouter deux étiquettes streptavidine précédées d'un site de clivage de la protéase 3C du rhinovirus humain en C-ter de HELZ2 (Figure 30A). Le service Baculovirus de l'institut a réalisé une cotransfection de ce plasmide donneur et d'un bacmide dans les cellules d'insectes. Le service a produit et amplifié le virus, j'ai ensuite collaboré avec Evelina Edelweiss pour effectuer une infection de cellules Sf9. Après trois jours les cellules ont été récoltées, lavées dans du PBS puis lysées par sonication dans le tampon de charge. Des échantillons de 5, 10 et 15 μ L d'un lysat de cellules infectées et non-infectées ont été déposés sur un SDS-PAGE. Un western blot a été réalisé en utilisant un anticorps commercial dirigé contre HELZ2. (Un test de l'anticorps est présenté au paragraphe 3.3.2). On observe une bande qui est uniquement présente dans les cellules infectées. Cette bande se situe au-dessus de 250 kDa (le marqueur de plus grande taille disponible), ce qui peut correspondre à la protéine recombinante 3xFlag-HELZ2-TwinStrep qui a une masse moléculaire théorique de 305 kDa (Figure 30B).

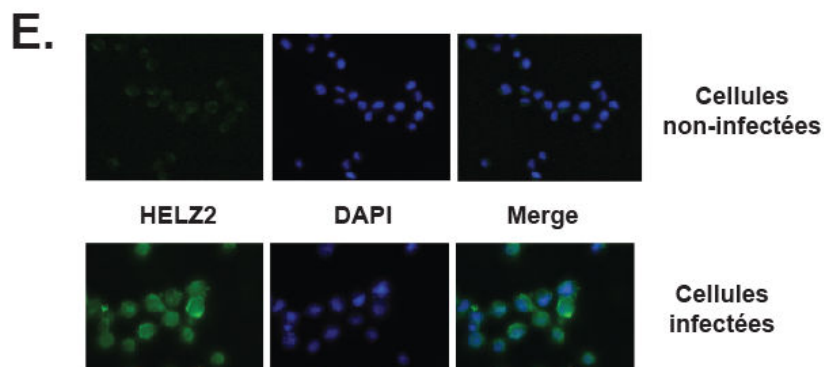
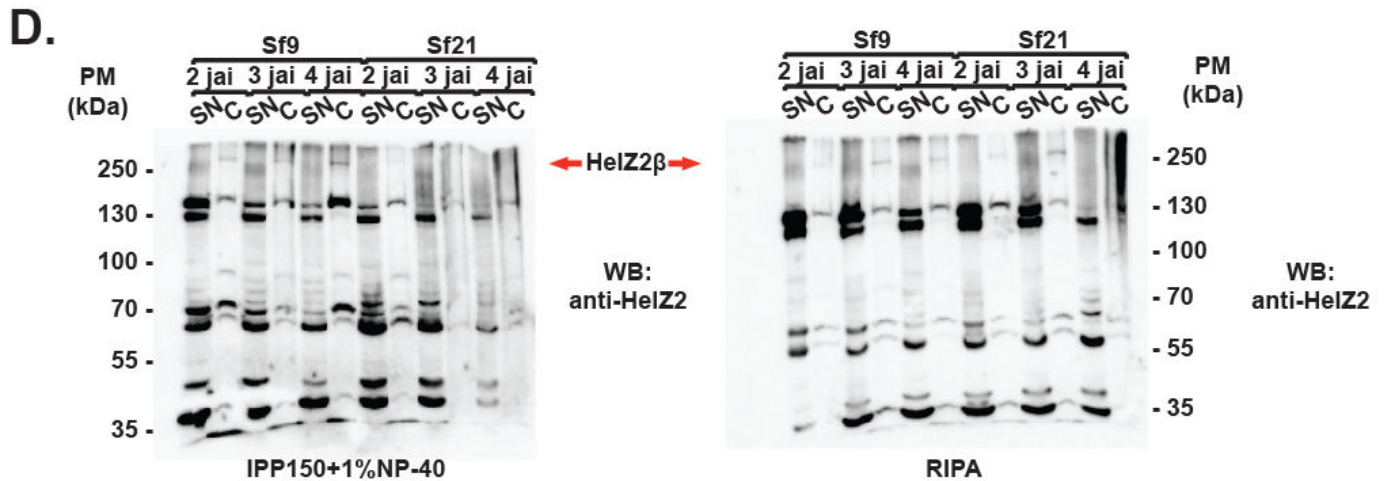
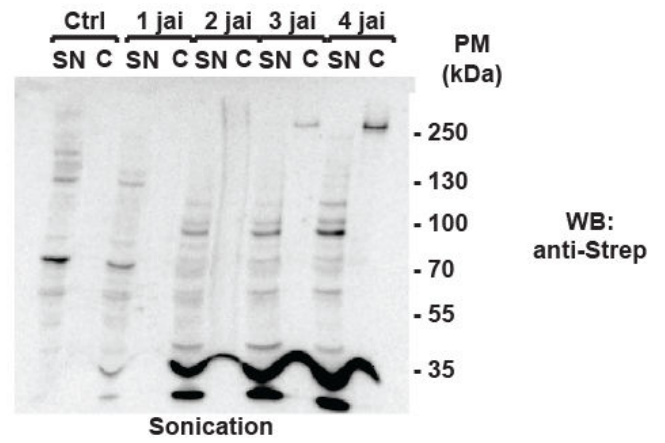
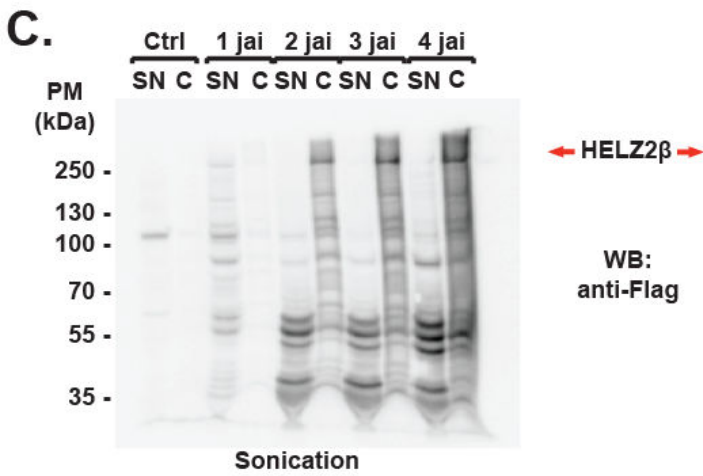
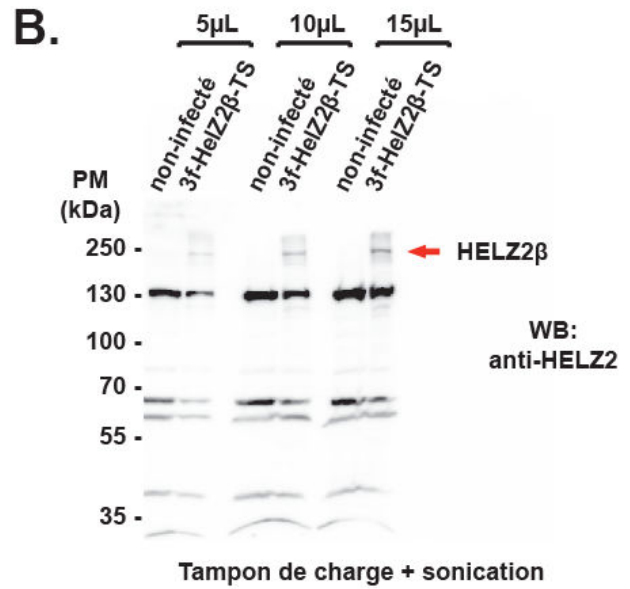
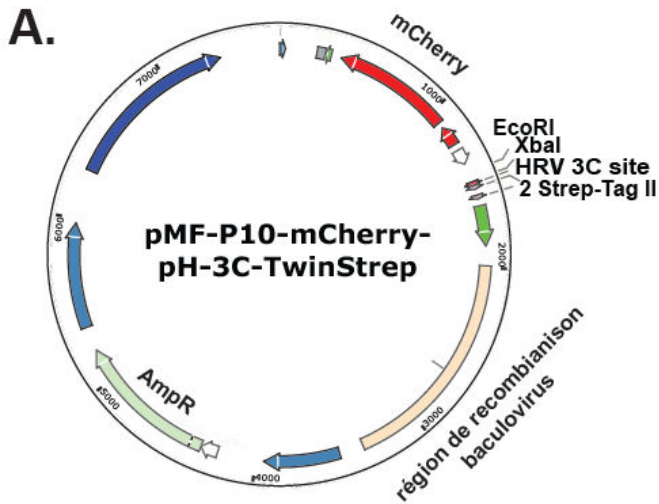


Figure 30 : Production de la protéine recombinante HELZ2 β dans les cellules d'insectes : A) Schéma du clonage de la séquence codante pour 3xFlag-EK-HELZ2-HRV3C-TwinStrep. En haut, le plasmide de départ plasmide pMF-p10-mCherry-pH-3C-TwinStrep. En bas, l'insert EcoRI-3xFlag-EK-HELZ2 β -XbaI créé par PCR. B) Des cellules Sf9 ont été infectées avec le Baculovirus codant pour la protéine 3xFlag-HELZ2 β -TwinStrep ou non-infectées. Elles ont été lysées par sonication dans le tampon de charge. Les lysats cellulaires ont été analysés par western blot en utilisant un anticorps commercial dirigé contre HELZ2. La flèche rouge désigne la bande correspondant à la protéine 3xFlag-HELZ2 β -TwinStrep. C) Des cellules Sf9 ont été infectées et récupérées 1, 2, 3 et 4 jours après infection. Les cellules ont été lysées par sonication, le surnagent (SN=protéines solubles) a été séparé du culot (C=protéines insolubles). Les échantillons ont été analysés sur deux western blot différents, l'un révélé avec un anticorps anti-flag et l'autre avec un anti-Strep. D) Des cellules Sf9 et Sf21 ont été infectées et récupérées 2, 3 et 4 jours après infection. Les cellules ont été lysées par avec de l'IPP150+1% NP-40 (gauche) et du RIPA (droite), le surnagent (SN) et le culot(C) ont été séparés. Les échantillons ont été analysés par western blot et révélé avec l'anticorps anti-HELZ2. E) Immunofluorescence de cellules Sf9 infectées et non-infectées. Immunomarquage réalisé avec un anticorps anti-Flag. Le résultat a été visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence, les noyaux des cellules sont visualisés grâce à un marquage au DAPI en bleu et la protéine Flag-HELZ2-TwinStrep est visualisée en vert.

L'objectif suivant a été de déterminer le nombre de jours optimal après infection pour avoir un maximum de protéine tout en limitant la quantité de protéine dégradée. Pour cela, des cellules Sf9 ont été infectées et récupérées 1, 2, 3 et 4 jours après infection. Pour vérifier que la protéine soit complète, deux western blot ont été réalisés, l'un révélé avec un anticorps anti-flag et l'autre avec un anti-Strep. Afin de savoir si la protéine produite est soluble, les cellules ont été lysées par sonication, puis centrifugées pour séparer le surnagent (protéines solubles) du culot (protéines insolubles). Un western blot a été réalisé. On observe que la protéine est présente à 2, 3 et 4 jours après infection. On note aussi que la quantité est plus importante à 4 jours après infection. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux anticorps indiquant que la protéine est complète. La bande correspondant à la protéine complète est présente uniquement dans la fraction du culot et absente du surnagent indiquant que dans ces conditions la protéine est insoluble (Figure 30C).

Afin de trouver une condition dans laquelle la protéine est soluble, en plus des cellules Sf9 utilisées dans les premiers tests, des cellules Sf21 et High Five ont été testées. Plusieurs méthodes de lyse comme l'utilisation d'IPP150 + 1%NP-40 (tampon de lyse classique), de RIPA (multiples détergents), ou d'IPP500 + 1% NP-40 (forte concentration en sel) ont été testées. Comme montré sur la Figure 30D, la protéine est toujours retrouvée dans la fraction du culot uniquement. Des résultats similaires ont

été obtenus en utilisant de l'IPP500 + 1% NP-40 (résultats non montrés). En ce qui concerne les cellules High Five, aucune production de la protéine n'a été détectée (résultats non présentés).

Il y a plusieurs causes possibles à l'insolubilité des protéines recombinantes, comme la formation d'agrégats ou une forte interaction avec l'ADN. Pour étudier ces deux possibilités, des cellules infectées et non-infectées ont été cultivées dans des boîtes où des lamelles de verre ont été préalablement placées. Quatre jours après infection les lamelles ont été récupérées. Les cellules ont été fixées et un immunomarquage avec des anticorps fluorescents anti-Flag a été réalisé. Le résultat a été visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence, les noyaux des cellules étant visualisés grâce à un marquage au DAPI. Aucun signal n'est détectable pour l'immunofluorescence anti-Flag dans les cellules non-infectées. Dans les cellules infectées on détecte un signal anti-Flag cytoplasmique mais principalement présent à la périphérie du noyau comme le montre la Figure 30E. Montrant qu'il n'y a pas d'interaction entre l'ADN qui est nucléaire et HELZ2 *in cellulo*, cependant, l'interaction peut avoir lieu durant la lyse.

Malgré toutes les conditions testées, la protéine HELZ2 β est restée insoluble. Il n'est pas impossible qu'en modifiant certains paramètres ou en mutant la séquence protéique, il soit possible d'obtenir la protéine recombinante soluble, mais une telle approche a été considérée comme fastidieuse et risquée.

[3.2.2 Production de protéine recombinante GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293](#)

Comme la production de protéine recombinante en cellule d'insecte n'a pas permis d'obtenir la protéine utilisable pour des essais *in vitro*, une autre méthode a été choisie. Cette méthode est l'expression transitoire de protéine HELZ2 étiquetée GFP à l'extrémité N-terminale dans des cellules humaines. J'ai donc entrepris le clonage de l'ADNc des deux isoformes dans le vecteur pEGFP-C1. Une réaction de PCR avec des oligonucléotides partiellement complémentaires ont permis d'ajouter un site EcoRI en 5' et un site Sall en 3' en aval du codon STOP des deux ADNc. Le site EcoRI a été ajouté en amont du codon d'initiation de manière à respecter le cadre de lecture de la séquence de la GFP dans la construction finale. Après avoir trouvé l'enzyme ainsi que les conditions optimales, des quantités suffisantes de produit de PCR ont été synthétisées, purifiées sur gel en incisant la bande puis en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de la société Macherey Nagel. L'insert a ensuite été digéré par

EcoRI et Sall. En parallèle, le plasmide pEGFP-C1 a été digéré et déphosphorylé pour éviter qu'il se referme sur lui-même. L'insert et le plasmide ont ensuite été ligués et introduits dans *E. coli*. Un criblage par digestion sur des ADN extrait par minipréparation a permis de sélectionner les clones ayant incorporé l'insert dans sa totalité. L'absence de mutation dans toute la séquence codante pour la protéine GFP-HELZ2 a été vérifiée par de multiples séquençages utilisant la méthode Sanger. Ces derniers ont été réalisés par la société GATC.

Les plasmides ainsi obtenus ont été transfectés en différentes quantités dans des cellules HEK293, deux jours plus tard les cellules ont été collectées et lysées avec du tampon IPP150 + 1% NP-40. Afin de tester l'expression des protéines GFP-HELZ2 α et β les échantillons ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 8% suivi d'un western blot révélé avec des anticorps anti-GFP et anti-tubuline pour contrôle de charge (Figure 31). On observe une bande supérieure à 250 kDa pour l'isoforme β et une bande légèrement inférieure pour l'isoforme α .

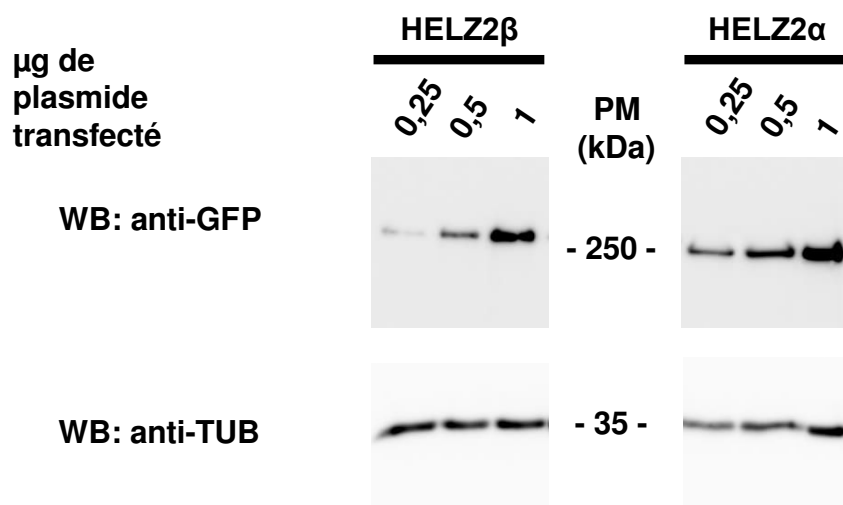


Figure 31 : Production de la protéine GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293 : Des cellules HEK293 ont été transfectées avec différentes quantités de plasmide pEGFPC1-HELZ2 α ou β . Les lysats cellulaires ont été analysés par western blot révélé avec un anticorps anti-GFP et un anti-tubuline pour contrôle de charge.

J'ai ensuite immunoprécipité les protéines avec les billes d'agarose GFP-Trap®_A ou leur version magnétique agarose GFP-Trap®_MA de la société ChromoTek. La différence entre les deux versions est discutée en 3.2.5. La spécificité de ces billes consiste en la conjugaison directement sur les billes d'un « nanobody » (13 kDa). Ce

« nanobody » correspond uniquement au domaine de liaison à la GFP d'anticorps produits chez l'alpaga qui ont la particularité d'être composé uniquement de chaînes lourdes. J'ai choisi ces billes car leur grande affinité et spécificité permet d'utiliser les protéines pour mes différents essais directement sur les billes après lavages.

3.2.3 [Essais ATPase](#)

Notre analyse de la protéine HELZ2 a révélé la présence de deux domaines hélicases potentiels dans l'isoforme β . Comme présenté en introduction, de tels domaines hélicases contiennent des domaines ATPase permettant d'apporter l'énergie nécessaire à l'ouverture de brins d'acides nucléiques (Singleton, Dillingham, et Wigley 2007). L'objectif était donc de démontrer la capacité de ces deux domaines d'hydrolyser l'ATP en ADP. Pour ces tests j'ai décidé d'utiliser uniquement l'isoforme β car le premier domaine hélicase est tronqué dans l'isoforme α . Par alignement de séquence des acides aminés responsables de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP du motif II ont été identifiés (flèches bleues Figure 28A). L'acide aspartique et l'acide glutamique correspondant ont été mutés en deux alanines. Un plasmide codant pour l'isoforme β avec les deux domaines mutés ont été produits par mutagenèse dirigée. Pour étudier si un substrat est nécessaire ou capable d'augmenter l'activité ATPase des domaines hélicase, les expériences ont été réalisées en présence et absence d'un extrait d'ARN total. Brièvement, les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour la GFP, GFP-HELZ2 sauvage et mutant pour les deux domaines hélicase. Les protéines ont été immunoprécipitées avec les billes GFP-Trap_MA. Les protéines ont été incubées à 37°C en présence d'ATP- α -³²P avec et sans ARN total. Des aliquotes ont été prélevées à 0 et 90 minutes. Un western blot avec un anticorps anti-GFP a été réalisé afin de vérifier que les protéines ont bien été produites et immunoprécipitées à des niveaux similaires. Pour étudier les activités ATPase des différentes protéines, les aliquotes du surnageant ont été déposées sur une membrane afin de réaliser une chromatographie en couche mince ou « Thin Layer Chromatography » (TLC). Les premiers essais ont été infructueux puisqu'une forte activité ATPase a été observée dans les échantillons GFP-HELZ2 WT ainsi que le double mutant des deux hélicases. Le contrôle GFP seul montrait également une activité ATPase mais moindre (résultats non montrés). Nous avons fait l'hypothèse que des protéines chaperonnes permettant le repliement des différentes protéines dans les cellules HEK293 étaient co-précipitées. En effet de telles protéines

chaperonnes sont connues pour être capable d'hydrolyser l'ATP en ADP. L'activité très forte observée avec GFP-HELZ2 WT et mutant s'expliquerait par la taille imposante de la protéine donc par conséquent, par un grand nombre de protéines chaperonne.

Afin de tester cette hypothèse, plusieurs lavages rapides avec une forte concentration d'ATP froid permettant de décrocher ces chaperonnes ont été réalisés avant d'effectuer le test ATPase. Le western blot de contrôle démontre que les protéines GFP, GFP-HELZ2 WT et hélicase double mutant sont toutes présentes sur les billes et que les lavages supplémentaires n'ont pas induits de perte ni de dégradation (Figure 32A). Les protéines HELZ2 WT et mutantes immunoprécipitées étant quantitativement présentent de manière identique, ceci nous permet de comparer leurs activités ATPase.

Dans la première ligne de cette TLC, un échantillon où l'ATP marqué a été incubé avec du GDP et de la protéine NDK a été déposé. Cette protéine permet de transférer un phosphate de l'ATP sur le GDP pour le transformer en GTP, ceci nous permet de visualiser l'ADP radioactif. Dans la seconde ligne l'ATP marqué a été déposé. Les lignes suivantes correspondent aux aliquotes prélevés au temps 0 dans les échantillons GFP, GFP-HELZ2 sauvage puis le mutant hélicase en absence et en présence d'ARN total. Les échantillons prélevés après 90 minutes d'incubation ont ensuite été déposés dans le même ordre. On observe qu'au temps 0 il n'y a que de l'ATP dans tous les échantillons. Après 90 minutes, on observe qu'en présence de la GFP il n'y a qu'un niveau de fond d'ADP détecté, alors qu'en présence de HELZ2 WT il y a production conséquente d'ADP. En présence de la protéine HELZ2 hélicase double mutant on observe un profil similaire à celui trouvé en présence de la GFP. On observe aussi qu'il n'y a aucune différence en présence ou en absence d'ARN total. Cette expérience a permis de démontrer pour la première fois que les domaines hélicases de la protéine HELZ2 sont capables d'hydrolyser l'ATP en ADP. On en conclut que l'activité ATPase n'est pas stimulé par de l'ARN exogène. Deux raisons sont possibles, soit il y a déjà de l'ARN co-purifié avec la protéine, soit l'ARN ne stimule pas cette activité.

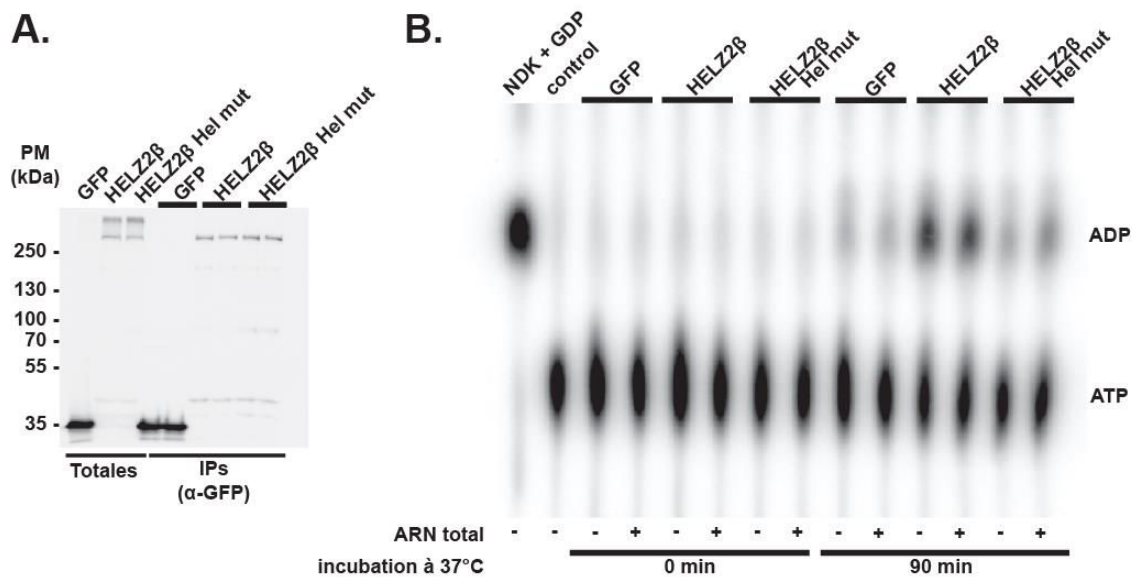


Figure 32 : Test *in vitro* d'activité ATPase de HELZ2β : Les protéines GFP, GFP-HELZ2β sauvage et le mutant pour les deux domaines hélicases permettant d'abolir la fixation et l'hydrolyse de l'ATP ont été produites dans les cellules HEL293 et purifiées avec les billes GFP-Trap_MA comme décrit dans le matériel et méthodes. Le devenir de l'ATP- α -³²P a été analysé après incubation avec les différentes protéines (A) Contrôle d'immunoprécipitation des protéines par western blot révélé avec un anticorps anti-GFP. (B) Le surnageant des différents échantillons a été analysé par chromatographie en couche mince ou « Thin Layer Chromatography » (TLC). Un échantillon contrôle permettant d'observer l'ADP radioactif a été déposé en premier. La seconde ligne montre l'ATP seul. Ensuite, ont été déposés les échantillons sans (-) et avec (+) ARN total en présence de GFP, HELZ2β sauvage et hélicase mutant à 0 puis à 90min.

3.2.4 Etude *in vitro* de l'activité nucléase de HELZ2

3.2.4.1 GFP-HELZ2 ne dégrade pas l'ADN mais dégrade l'ARN

3.2.4.1.1 Test d'activité nucléase de HELZ2 β

Après avoir démontré que les domaines hélicases ont une activité ATPase, je me suis intéressé au domaine RNase potentiel présent au centre de la protéine HELZ2. Comme indiqué ci-dessus, le domaine RNB de HELZ2 est divergent pour l'un des quatre acides aspartiques très conservés dans toutes les protéines contenant un domaine RNB étant une asparagine dans la séquence protéique de HELZ2. Avant d'étudier si ce domaine est actif *in vitro*, un contrôle négatif a été construit. Pour cela, une mutation ponctuelle a été introduite dans la séquence de HELZ2β préalablement insérée dans le plasmide pEGFP-C1. Cette mutation est la substitution D1354N car la mutation équivalente est connue pour abolir l'activité catalytique du domaine RNB

dans les autres protéines de la famille (Figure 29) (Amblar et Arraiano 2005). Pour tester l'activité nucléase de HELZ2, un oligonucléotide d'ADN synthétique de 35 nucléotides de long a été marqué à son extrémité 5' avec une molécule de fluorescéine. Le même procédé a été utilisé pour marquer un oligonucléotide d'ARN synthétique de 20 nucléotides de long. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour la GFP, GFP-HELZ2 β WT et RNB mutant. Les protéines ont été immunoprécipitées avec les billes GFP-Trap_A, puis les oligonucléotides ADN et ARN fluorescents ont été ajoutés dans un tampon contenant des ions magnésium. La réaction a été incubée à 37°C avec agitation régulière et des aliquotes ont été récupérés à 0, 5, 15, 30 et 60 min. A la fin de l'expérience, le matériel présent sur les billes a été analysé par western blot afin de vérifier que les protéines ont bien été produites et immunoprécipitées à des niveaux similaires. Sur ce contrôle, on observe que les protéines GFP, GFP-HELZ2 β WT et RNB mutant sont toutes produites et que des quantités similaires des protéines HELZ2 WT et mutant ont été immunoprécipitées. Ceci nous permet de comparer leurs activités nucléases (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.A**).

Après dénaturation, les échantillons d'acides nucléiques ont été déposés sur un gel dénaturant d'acrylamide comportant de l'urée. Après migration, un Typhoon FLA laser scanner a été utilisé afin de détecter la fluorescéine présente sur les acides nucléiques et de la quantifier. Dans les deux premiers puits, un oligonucléotide d'ARN a été digéré partiellement par la RNaseT1 ou par hydrolyse alcaline afin de servir d'échelles de taille nous permettant d'évaluer la longueur des fragments observés. Le 3^{ème} puit contient l'ADN substrat seul et le suivant contient l'ARN substrat uniquement. J'ai ensuite déposé les échantillons qui ont été mis en présence de la GFP, suivi de ceux qui ont été mis en présence de HELZ2 WT puis du mutant RNB. L'analyse de la bande correspondant à l'ADN révèle que la quantité de matériel dans la bande de 35 nucléotides reste constante à tous les temps d'incubation quelle que soit la protéine utilisée. Ceci indique que la protéine HELZ2 n'a pas d'activité désoxyribonucléase. L'analyse du devenir de l'oligonucléotide d'ARN en présence de la GFP seule met en évidence une légère dégradation du 20 mer en 19 mer après 1 heure d'incubation (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.B**). En revanche, en présence de HELZ2 WT dès 5 minutes d'incubation, il ne reste plus que 47% du 20 mer d'ARN et plus que 9% après 15 minutes.

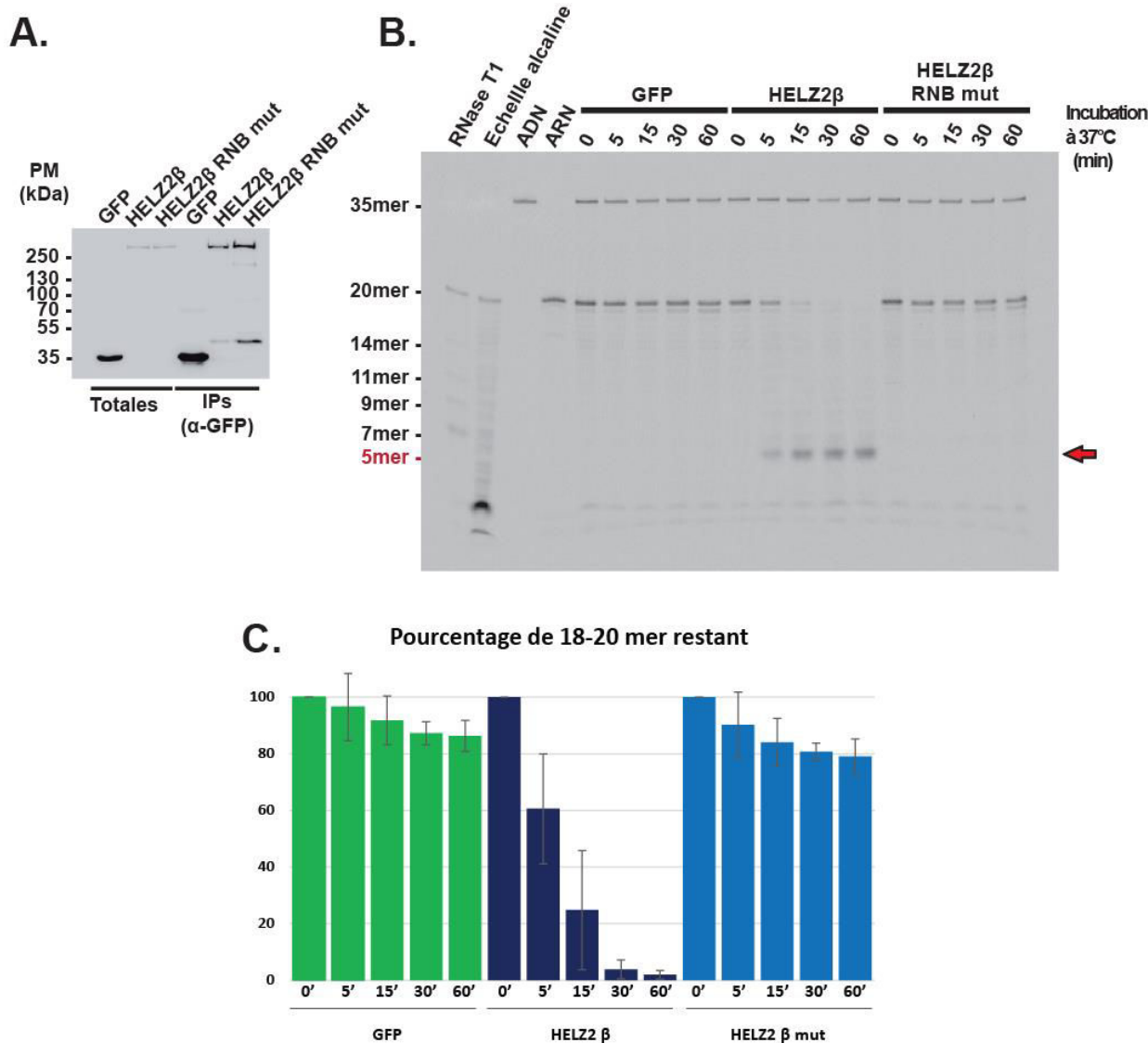


Figure 33 : Test in vitro de l'activité nucléase de HELZ2 β : les protéines GFP, GFP-HELZ2 β sauvage et GFP-HELZ2 β RNB mut, (un mutant pour le domaine RNB connue pour abolir l'activité de ce domaine) ont été produites dans les cellules HEK293 et purifiées en utilisant les billes GFP-Trap_A comme décrit dans le matériel et méthodes. Les substrats ADN (35 nts) et ARN (20 nts) marqués en 5' avec de la fluorescéine ont été analysés au cours d'une cinétique. (A) Contrôle d'immunoprécipitation des protéines par western blot révélé avec un anticorps anti-GFP. (B) Les acides nucléiques présents dans les différents échantillons ont été fractionnés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Des marqueurs de tailles ont été déposés dans les deux premières lignes suivis de l'ADN et de l'ARN seul. Ensuite ont été déposés les échantillons des cinétiques en présence de GFP, HELZ2 β sauvage et RNB mutant. La flèche rouge désigne le produit final de dégradation. (C) Quantification du produit de départ présent aux différents temps de réaction. Les quantifications ont été réalisées avec ImageJ (n=4).

En parallèle, de cette disparition on observe l'apparition d'une bande correspondant à un 5 mer d'ARN. Ce résultat démontre que la protéine HELZ2 est une nouvelle RNase humaine. On observe ensuite que cette activité nucléase est perdue en utilisant le mutant ponctuel abolissant l'activité catalytique du domaine RNB. En effet, le profil est similaire à celui obtenu avec la GFP. Cette observation démontre que le domaine RNB est responsable d'une activité RNase 3'-5' libérant un produit final de 5 nucléotides de long. Ce résultat est cohérent avec les observations faites avec les autres protéines de la famille RNaseII/RNB comme la RNase II et Dis3 puisqu'elles relarguent toutes des fragments finaux faisant entre 2 et 5 nucléotides de long (Barbas et al. 2008; Matos, Barbas et Arraiano 2009; Rafal Tomecki et al. 2010). Sur ce gel, en présence de GFP-HELZ2 β WT, on observe très peu d'accumulation de fragments de taille intermédiaire entre le 20 mer d'ARN de départ et le 5 mer final. On observe aussi simultanément le produit final de la réaction alors qu'une fraction du substrat initial est encore intacte. Ces observations suggèrent que HELZ2 est une RNase avec une processivité importante.

3.2.4.1.2 Test d'activité nucléase de HELZ2 α

Comme décrit précédemment, l'isoforme α est un isoforme tronqué en N-ter qui ne comporte pas les doigts de zinc et dont la majeure partie du premier domaine hélicase est absente. Je me suis demandé si l'activité catalytique portée par le RNB dans l'isoforme β était aussi présent dans l'isoforme α en l'absence des domaines N-terminaux. Pour cela j'ai construit la même mutation inactivant le RNB et j'ai réalisé la même expérience que décrite précédemment.

Sur le western blot de contrôle on observe que les différentes protéines sont produites et immunoprécipitées à des quantités équivalentes (Figure 34A) ce qui nous permet de comparer leurs activités nucléases après fractionnement des produits dans un gel dénaturant acrylamide-urée. L'analyse des signaux fluorescents révèle les mêmes profils obtenus pour l'isoforme β de HELZ2. Une légère différence de dégradation après 5 minutes d'incubation est observée puisqu'il reste encore 96% du substrat ARN initial mais cette différence disparaît dès 15 minutes car il reste plus que 11% du 20mer d'ARN. On observe aussi l'apparition d'un 5mer final et la disparition de cette activité nucléase lors de l'utilisation de la version mutante de la plus petite isoforme (Figure 34B).

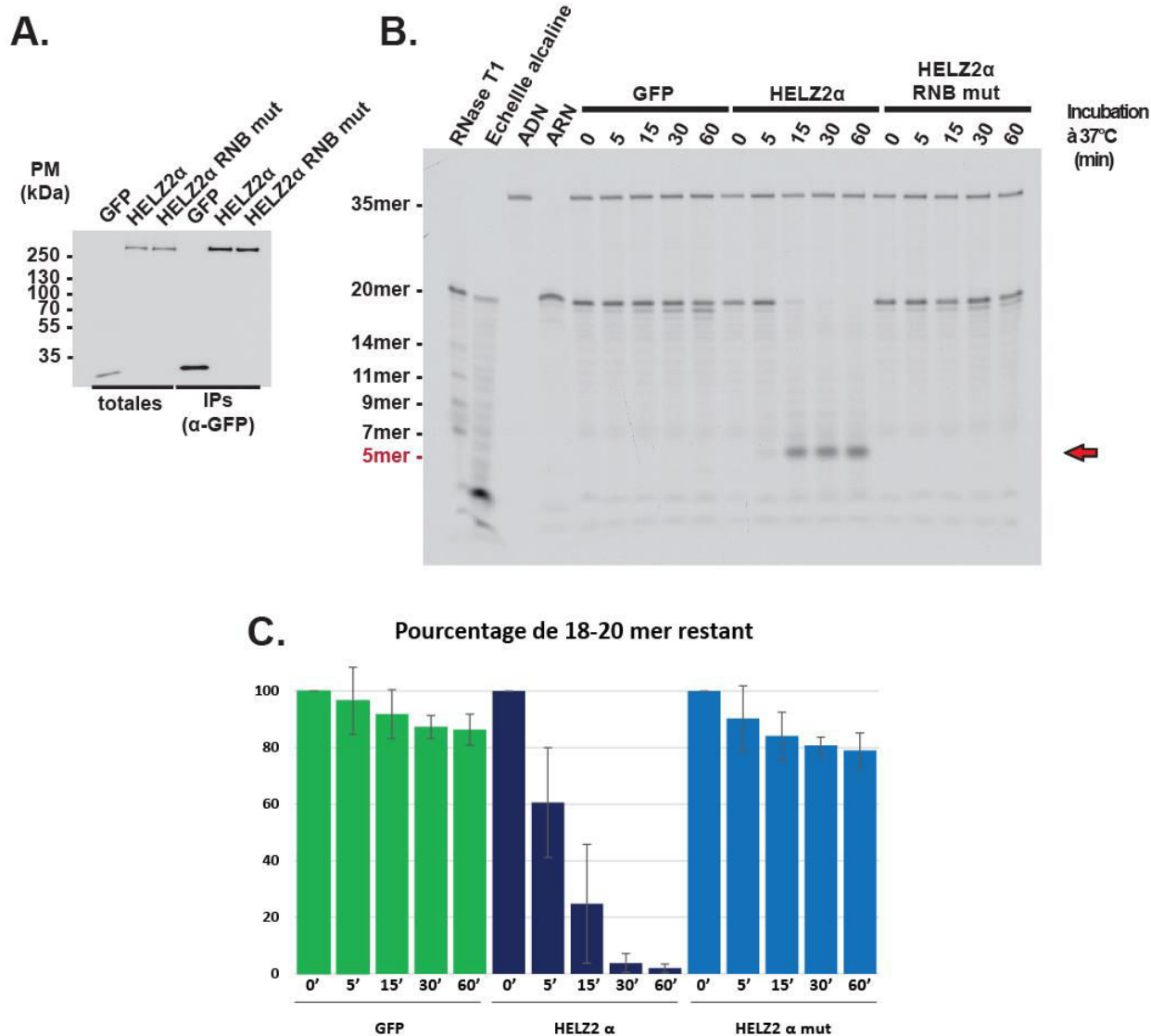


Figure 34 : Test in vitro de l'activité nucléase de HELZ2 α : les protéines GFP, GFP-HELZ2 α sauvage et GFP-HELZ2 α RNB mut, (un mutant pour le domaine RNB connue pour abolir l'activité de ce domaine) ont été produites dans les cellules HEK293 et purifiées en utilisant les billes GFP-Trap_A comme décrit dans le matériel et méthodes. Les substrats ADN (35 nts) et ARN (20 nts) marqués en 5' avec de la fluorescéine ont été analysés au cours d'une cinétique. (A) Contrôle d'immunoprécipitation des protéines par western blot révélé avec un anticorps anti-GFP. (B) Les acides nucléiques présents dans les différents échantillons ont été fractionnés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Des marqueurs de tailles ont été déposés dans les deux premières lignes suivis de l'ADN et de l'ARN seul. Ensuite ont été déposés les échantillons des cinétiques en présence de GFP, HELZ2 α sauvage et RNB mutant. La flèche rouge désigne le produit final de dégradation. (C) Quantification du produit de départ présent aux différents temps de réaction. Les quantifications ont été réalisées avec ImageJ (n=2).

3.2.4.2 Etude des ions nécessaires à l'activité RNase

Les expériences précédentes ont démontré que les deux isoformes de HELZ2 possèdent une activité RNase dans un tampon comportant des ions magnésium. Les autres enzymes comportant un domaine RNB utilisent certains cations divalents comme le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} pour exercer leur activité nucléase (Reis et al. 2013). Par ailleurs, il a été démontré qu'une forte concentration d'ions magnésium est capable d'inhiber l'activité nucléase des protéines de cette famille (Dziembowski et al. 2007). Afin de caractériser au mieux HELZ2 il est nécessaire de savoir quels ions sont nécessaires à l'activité catalytique de son domaine RNB. Il est aussi important de savoir si une forte concentration en ions magnésium aura les mêmes conséquences que sur les protéines comportant un RNB.

La même expérience que précédemment a été réalisée mais avec des tampons contenant des cations divalents différents. Le tampon précédent (0,1 mM d'ions magnésium) a été utilisé comme contrôle positif. Les autres tampons testés contiennent soit 2.5 mM d'ions magnésium, soit 0.1 mM d'ions divalents manganèse, zinc, cuivre, cobalt, nickel ou calcium. Des aliquotes ont été prélevées uniquement aux temps 0 et 30 minutes après incubation car les expériences précédentes ont démontré que la réaction de dégradation était totale après 30 minutes. Les échantillons prélevés à 0 min ont été déposés dans l'ordre énuméré ci-dessus suivi des aliquotes prélevées à 30 minutes après incubation à 37°C (Figure 35).

On observe tout d'abord que la quantité de matériel dans la bande supérieure correspondant au 35mer d'ADN est constante dans tous les échantillons. Ce qui indique que HELZ2 n'a pas d'activité DNase quel que soit le cation divalent testé. Pour cette expérience, un nouveau lot d'oligonucléotide ARN a été marqué. Au début de l'expérience on observe la bande principale d'ARN qui correspond au 20mer mais aussi plusieurs bandes de taille et d'intensité plus faible. Ces bandes correspondent à des fragments plus courts dus à une légère dégradation de l'oligonucléotide qui a été utilisé et qui est présente dès le marquage à la fluorescéine. L'analyse des ARN après 30 min d'incubation révèle l'absence de dégradation en absence d'ions dans le tampon. En présence d'ions Mg^{2+} à 0,1 mM (contrôle) on retrouve l'activité RNase observée dans les expériences précédentes avec l'apparition du 5 mer final. Une activité similaire est retrouvée en présence de 2,5 mM d'ions Mg^{2+} et 0,1 mM d'ions Mn^{2+} . Une activité plus faible mise en évidence par des produits de petites tailles est

retrouvée en présence des ions Co^{2+} et Ni^{2+} . Aucune activité n'est détectée en présence des ions Zn^{2+} et Cu^{2+} . On note une légère diminution du 20 mer d'ARN en présence de Ca^{2+} mais les produits de dégradation ne correspondent pas au 5 mer. La dégradation en présence de Ca^{2+} n'a pas été reproduite donc ce résultat est dû à une contamination.

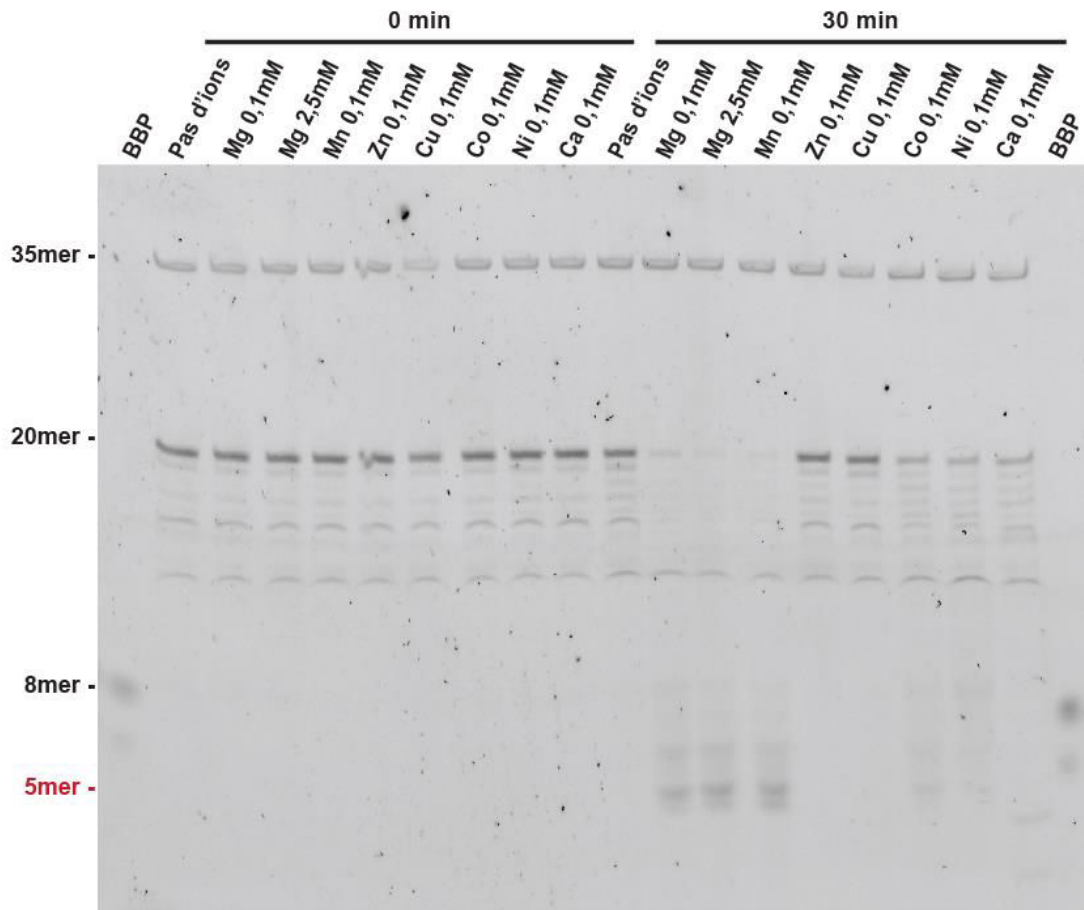


Figure 35 : Influence de la présence de différents ions divalents sur l'activité catalytique de HELZ2 β : la protéine GFP-HELZ2 β WT a été produite puis purifiée en utilisant les billes GFP-Trap_MA. Les substrats ADN et ARN ont été analysés au cours d'une cinétique en présence de différents cations divalents. L'immunoprécipitation des protéines a été contrôlée par western blot (non montré). Du bleu de bromophénol (BBP) sert de marqueur de taille. Les acides nucléiques ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant. Les échantillons correspondant au temps 0 minute ont été déposés en premier suivi des échantillons récoltés après 30 minutes d'incubation (n=3).

3.2.4.3 Détermination de la protéine minimale active

Afin de caractériser au mieux l'activité nucléase de HELZ2, l'identification de la protéine minimale active, et par conséquent des domaines essentiels, a été entreprise. Pour étudier cette question, plusieurs clonages permettant d'exprimer des protéines tronquées ont été réalisés. Les différentes constructions sont présentées en Figure

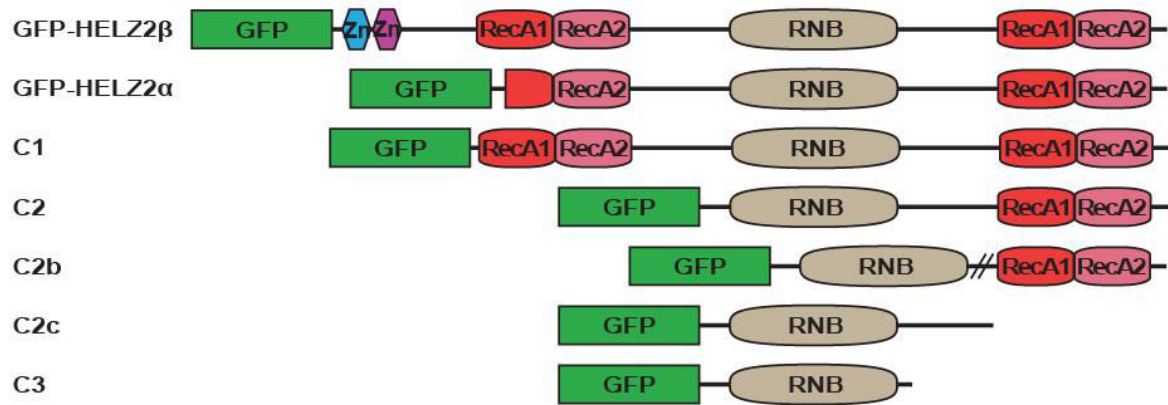
36A. La première construction (C1) code une protéine ne comprenant pas les doigts de zinc présent en N-ter de l'isoforme β mais comprend les deux domaines hélicases, le domaine RNB ainsi que les linkers entre ces domaines. Dans la seconde construction (C2) les doigts de zinc ainsi que le premier domaine hélicase a été amputé. A partir de la construction C2, les constructions C2b et C2c ont été construites. Dans la construction C2b, le linker entre le RNB et le second domaine hélicase a été supprimé et dans la construction C2c le second domaine hélicase a été retiré mais le linker a été gardé. La construction C3 code pour le RNB seul toujours étiqueté avec la GFP.

Les plasmides codants ces différentes constructions ainsi que celui exprimant la GFP seule, HELZ2 β WT et RNB mutant ont été transfectés dans les cellules HEK293, suivi d'une immunoprécipitation avec les billes GFP-Trap_MA puis du test nucléase identique à celui décrit en 3.2.4.1.1 (Test d'activité nucléase de HELZ2 β). Pour ce test des aliquotes ont été prélevées aux temps 0 et 30 minutes après incubation. Un western blot pour vérifier que les protéines ont été produites et immunoprécipitées à des niveaux similaires a été réalisé. En parallèle, les échantillons d'acides nucléiques ont été analysés sur gel d'acrylamide-urée.

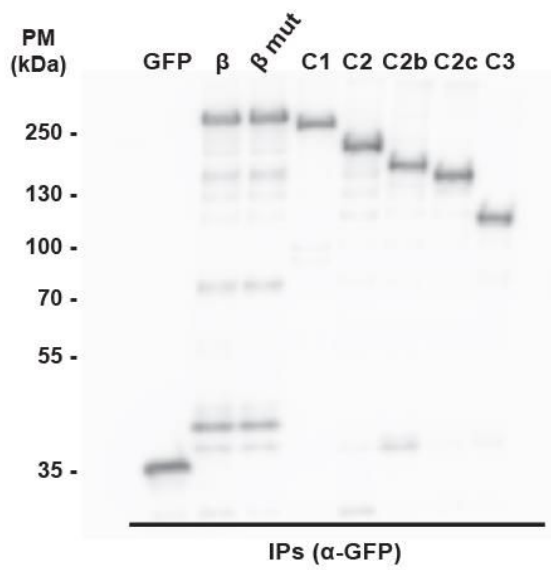
On observe sur le western blot que les protéines GFP, HELZ2 β WT, RNB mutant ainsi que les constructions C1 à C3 ont été immunoprécipitées de manière quantitativement similaire (Figure 36B). Ceci nous permet de faire une étude comparative des activités nucléases par analyse des produits détectés dans le gel d'acrylamide-urée (Figure 36C). On n'observe aucune dégradation du 35 mer d'ADN dans toutes les conditions testées. Par contre une diminution de la bande d'ADN est visible dans les échantillons HELZ2 β , C1 et C2. Cette diminution est due à une modification du protocole du fait de l'utilisation des billes magnétiques et non plus agarose. Ceci sera discuté dans la partie 3.2.5. On n'observe aucune dégradation du 20 mer d'ARN en présence de la GFP après 30 minutes. L'activité ribonucléase de GFP-HELZ2 β est à nouveau détectée. Cette activité est abolie par la mutation ponctuelle dans le domaine RNB. Les constructions 1 et 2 montrent encore une activité RNase après 30 minutes d'incubation. En présence des constructions C2b, C2c et C3 aucune dégradation des ARN n'est visible.

Ce résultat nous apprend que le linker situé entre le RNB et le second domaine hélicase ainsi que ce dernier sont nécessaires à l'activité RNase.

A.



B.



C.

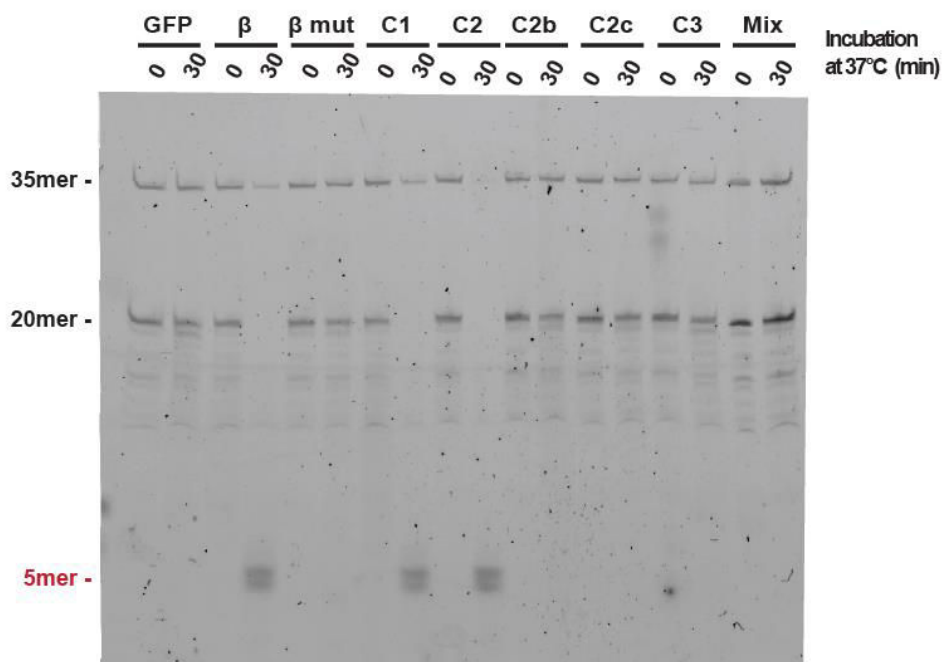


Figure 36 : Détermination des domaines essentiels à l'activité RNase : (A) Schéma des différentes constructions réalisées. Le rectangle vert représente la GFP, les hexagones bleu et violet les doigts de zinc, les domaines rouge et rose les domaines RecA et RecB des domaines hélicases et l'ovale gris le domaine RNB. Les protéines GFP, GFP-HELZ2β sauvage, RNB mutant ainsi que les autres constructions présentées sur le panneau A ont été produites puis purifiées en utilisant les billes GFP-Trap_MA. Les substrats ADN et ARN ont été analysés au cours d'une cinétique en présence de différents cations divalents. (B) L'immunoprécipitation des protéines a été contrôlée par western blot révélé avec un anticorps anti-GFP. (C) Les acides nucléiques ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant. Les échantillons mis en présence des différentes protéines ont été déposés dans l'ordre GFP, GFP-HELZ2β sauvage, RNB mut, construction 1, 2, 2b, 2c, 3 ont été déposés dans cet ordre. Ensuite un échantillon contrôle sans protéine a été déposé (n=2).

3.2.4.4 Etude de la spécificité de substrat

Il est connu que certaines RNase ont des spécificités différentes envers les différents nucléotides y compris dans la famille des RNaseII/RNB dont fait partie HELZ2. En effet, la protéine Dis3L2 dégrade préférentiellement les ARN ayant une queue poly(U) (Łabno et al. 2016). Afin d'étudier si une telle spécificité existe pour le RNB de HELZ2 des oligonucléotides chimères ADN-ARN ont été synthétisés (SIGMA-ALDRICH®). Ces oligonucléotides sont composés de dix désoxyribonucléotides de séquence définie en 5' suivi de douze ribonucléotides identiques (poly G, U, C ou A) (Figure 37A). Ils seront nommés oligonucléotide G, U, C et A respectivement. Ces oligonucléotides mixtes ont été marqués en 5' avec de la fluorescéine comme dans les expériences précédentes. Afin de contrôler la qualité des oligonucléotides et du marquage, ces derniers ont été déposés sur un gel dénaturant d'acrylamide 15% comportant de l'urée. Après migration, le Typhoon FLA laser scanner a été utilisé afin de détecter les ARN marqués. Dans les quatre premières lignes ont été déposés 1µL d'oligonucléotide G puis U, C et enfin A. Ensuite, 10µL et 20µL des mêmes échantillons ont été déposés dans le même ordre (Figure 37B). Aucune fluorescence pour l'oligonucléotide G n'est visible dans la piste où 1µL a été déposé. Cependant lorsque plus de matériel a été déposé, un faible signal correspondant à l'oligonucléotide G marqué est observé à la taille attendue. De plus, un signal juste sous le puit est observé. Ceci laisse à penser que la portion contenant un polyG forme des structures secondaires empêchant le marquage à la fluorescéine ainsi que la migration dans le gel. Il est possible que l'utilisation d'un tampon différent permette le marquage de cet oligonucléotide, mais ceci n'a pas été testé.

A.



B.



C.

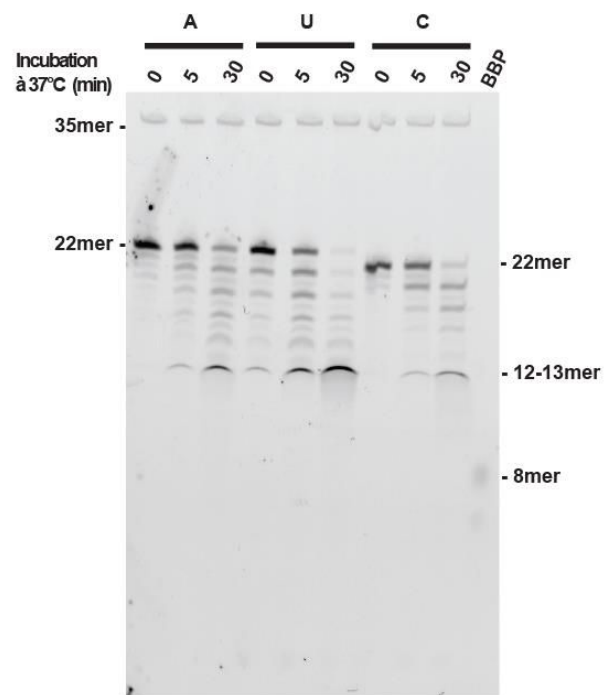


Figure 37 : Etude de la spécificité de substrat de HELZ2. (A) Schéma des oligonucléotides chimères utilisés. Ils ont été marqués à la fluorescéine en 5' et comportent dix déoxyribonucléotides mixtes suivi de douze ribonucléotides d'un seul type (poly G, U, C ou A). (B) Après marquage à la fluorescéine, 1µL, 10µL et 20µL des 4 oligonucléotides ont été analysés sur un gel d'acrylamide dénaturant (n=3). (C) La protéine GFP-HELZ2β sauvage a été produite puis purifiée en utilisant les billes GFP-Trap_MA. Les protéines ont été incubées en présence d'un oligonucléotide d'ADN (35 nts) et d'un oligonucléotide chimère A, U ou C du panneau B. L'immunoprécipitation a été contrôlée par western blot (non montré). Les aliquotes du surnageant ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant (n=1).

En ce qui concerne les oligonucléotides U, C et A, on observe des signaux équivalents. On note aussi qu'ils migrent à des positions légèrement différentes dues à leur différence de séquence.

Les trois oligonucléotides marqués (U, C et A) ont été utilisés pour étudier une spécificité préférentielle de HELZ2. Pour ceci le même schéma d'expérience ayant permis de démontrer l'activité catalytique du RNB a été suivie en utilisant ces différents oligonucléotides chimères comme substrat. Des aliquotes ont été prélevés a 0, 5 et 30

minutes après incubation. Les échantillons ont été analysés sur un gel dénaturant d'acrylamide 15% comportant de l'urée. Le Typhoon FLA laser scanner a été utilisé afin d'observer le devenir des différents oligonucléotides chimères. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, ces résultats sont donc préliminaires. On observe des profils similaires en présence des trois différents oligonucléotides. Cependant, une dégradation légèrement plus importante de l'oligonucléotide U est observée mais ce résultat nécessite d'être confirmé. On observe une alternance de bandes intenses et des bandes de faible intensité. L'explication de ce phénomène n'est pas encore connue. Une hypothèse est que la protéine fait une pause ou se détache du substrat dès qu'elle rencontre deux nucléotides identiques à la suite. Une dizaine de bandes de dégradation sont détectées avant un produit final qui migre approximativement à la taille d'un 12-13 mer (estimée par la migration du marqueur ADN et du bleu de bromophénol (BBP) (8 nucléotides dans ce type de gel)). Le produit final a la même taille pour tous les oligonucléotides chimères, on en déduit que HELZ2 est capable de dégrader au moins dix nucléotides des poly A, U et C. Il n'est pas possible de savoir si toute la partie ribonucléotidique est dégradée ou si certains résidus ARN subsistent. Des expériences plus précises seront nécessaires pour caractériser le produit final en détail. Il apparaît cependant que la partie ADN n'est pas dégradée, en accord avec nos autres résultats.

3.2.5 GFP-HeZ2 fixe l'ADN *in vitro*

Dans les expériences où les billes GFP-Trap_MA ont été utilisées une diminution de la quantité de l'oligonucléotide d'ADN a été observée dans les échantillons possédant une activité RNase (Figure 36C). Ce résultat n'est jamais apparu en utilisant les billes GFP-Trap_A. L'hypothèse que j'ai formulée pour expliquer cette observation est que HELZ2 est capable de séquestrer l'ADN en le fixant, et que suivant le type de bille utilisé, cette fixation était détectée ou non. L'hypothèse permettant d'expliquer la diminution de l'intensité de la bande d'ADN uniquement dans les échantillons où l'ARN est dégradé est que l'affinité de HELZ2 pour l'ARN est plus forte que pour l'ADN. En effet, avec les billes magnétiques, un aimant était utilisé pour les maintenir au fond du tube empêchant tout prélèvement de billes lors du prélèvement du surnageant contrairement aux billes d'agarose. Afin de tester cette possibilité, le même schéma d'expérience qui a permis de démontrer l'activité RNase de HELZ2 a été répété mais

en analysant non-seulement les acides nucléiques présents dans le surnageant en fin de réaction, mais aussi ceux restant fixés aux billes. Une extraction phénol-chloroforme a été réalisée sur ces billes pour extraire les acides nucléiques possiblement fixés sur les protéines, suivie d'une précipitation (fraction liée). La fraction non-liée est la fraction de surnageant analysée comme dans les autres expériences. Les protéines HELZ2 α et β RNB mutante ainsi que la construction C2 ont été utilisées pour ce test car une diminution de l'intensité de la bande d'ADN a été observée avec ces protéines. Les réactions avec l'oligonucléotide d'ADN ont été faites indépendamment des réactions en présence de l'oligo d'ARN.

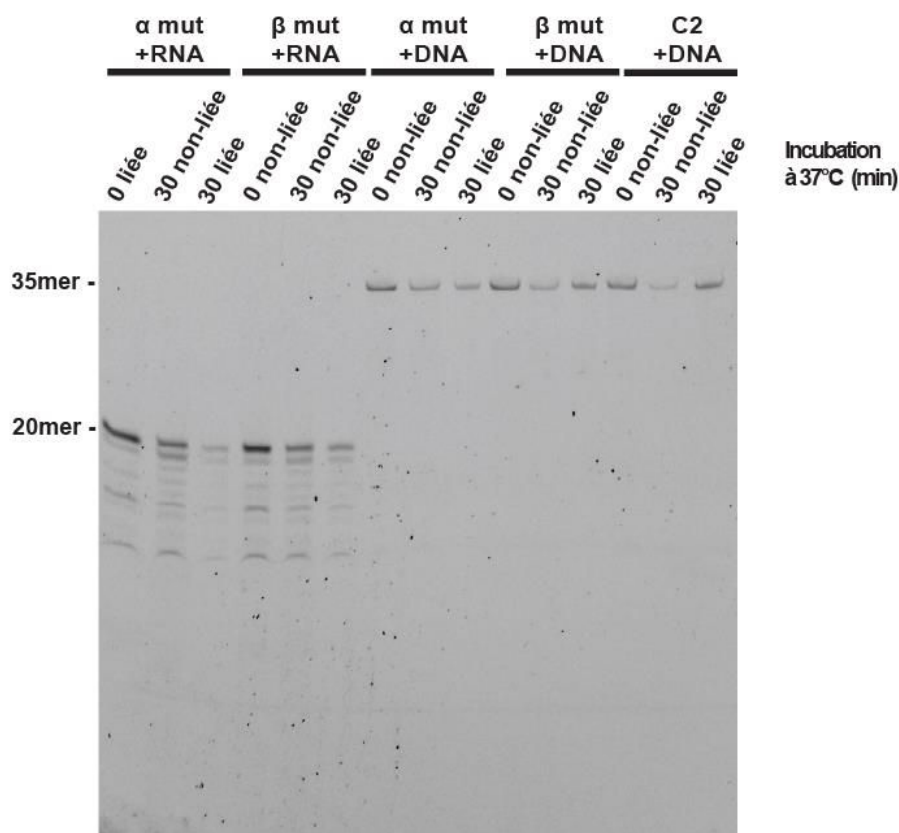


Figure 38 : Test de liaison aux acides nucléiques : Les protéines GFP-HELZ2 α et β RNB mutant ainsi que la construction 2 ont été produites puis purifiées avec les billes GFP-Trap_MA. Les protéines ont été incubées en présence de l'oligonucléotide d'ARN (20 nts) ou celui d'ADN (35 nts) préalablement marqués en 5' avec de la fluorescéine. Des aliquotes ont été prélevées à 0 et 30 minutes (fractions « non-liée»). A la fin de l'expérience, une extraction au phénol-chloroforme a été réalisée sur les billes, suivie d'une précipitation afin de récupérer les acides nucléiques présents sur les protéines immunoprécipitées (fraction « liée »). Les différents échantillons ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide dénaturant (n=2).

Les différentes fractions ont été déposées sur un gel d'acrylamide. Les réactions en présence de HELZ2 α puis β mutant pour le RNB ont été déposées en premier, suivi des échantillons d'ADN mis en présence de HELZ2 α puis β mutant pour le RNB, suivi de la construction C2 (Figure 38). Pour l'ARN en présence de HELZ2 α mutant, on observe que la bande présente dans la fraction non-liée à 30 minutes est légèrement plus faible que la bande présente à 0 minute. Cette observation corrélée à la présence d'une bande dans la fraction non-liée démontre que HELZ2 α mutant est capable de fixer l'ARN. On observe le même résultat pour HELZ2 β mutant. En ce qui concerne l'ADN, on observe qu'il y a des bandes équivalentes dans les fractions liée et non-liée. Pour ce qui est de l'ADN en présence de HELZ2 β mutant et la construction 2, on observe une bande plus forte dans la fraction liée que non-liée. Ces observations ont permis de conclure que la protéine HELZ2 est capable de lier l'ARN, ce qui était attendu au vu des résultats précédant. Cette expérience démontre aussi que HELZ2 est capable de lier l'ADN. Ces résultats étant préliminaires et le pourcentage d'ADN fixé sur les protéines variant d'une expérience à l'autre, aucune quantification n'a été réalisée.

3.3 Etude *in cellulo* de HELZ2

3.3.1 Localisation de GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293

3.3.1.1 Localisation des deux isoformes

La localisation de THRAP3, un partenaire de HELZ2, dans le noyau est décrite dans la littérature (K.-M. Lee, Hsu, et Tarn 2010). Afin de vérifier si les résultats de co-localisation de THRAP3 et HELZ2 décrites dans la littérature (Katano-Toki et al. 2013) peuvent être reproduites, ainsi que pour tester une co-localisation de ces deux facteurs, les plasmides codant pour les protéines GFP HELZ2- α ou β et HA-THRAP3 ont été transfectés dans des cellules HeLa WS. Après fixation et immunomarquage de THRAP3 grâce à un anticorps secondaire conjugué au DyLight® 549 ainsi qu'un marquage au DAPI, les lamelles ont été montées sur lames et observées au microscope à fluorescence à un grossissement 100X. Un exemple des résultats observés est montré dans la Figure 39A/B.

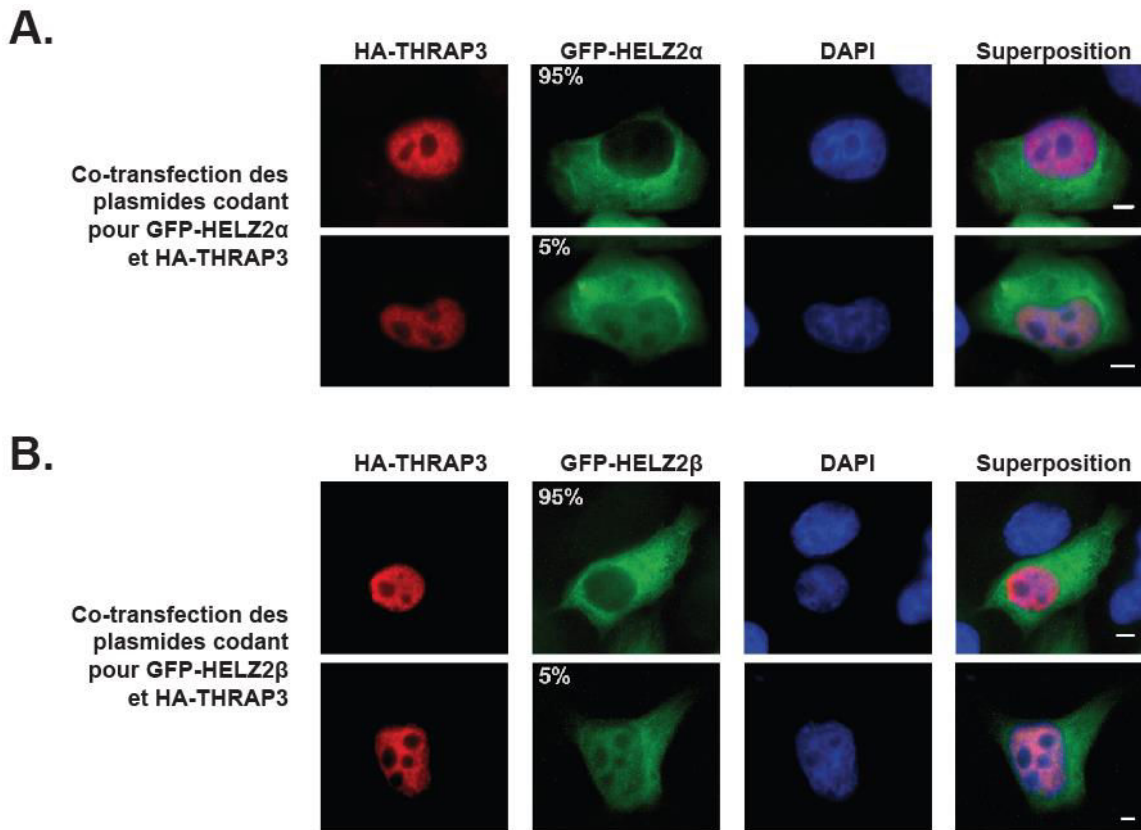


Figure 39 : localisation des deux isoformes de HELZ2 et e THRAP3. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant pour HA-THRAP3 et GFP-HELZ2 α (en haut) ou β (en bas). Un anticorps primaire anti-HA et un anticorps secondaire marqué au fluorophore rouge DyLight® 549 permettent de visualiser la protéine HA-THRAP3 (1^{ère} image). La GFP des protéines de fusion a été observée par fluorescence directe (2^{ème} image). Un marquage au DAPI permettant de visualiser l'ADN en bleu a aussi été réalisé (3^{ème} image). La 4^{ème} image correspond à la superposition des trois premières. Afin de connaître le pourcentage de cellules possédant chaque profil, 400 cellules ont été comptées. Le pourcentage de cellules compté est noté en haut à gauche de la case correspondante. Barre d'échelle = 1 μ m

La première image à gauche de chaque ligne représente l'immunomarquage de HA-THRAP3 en rouge, la seconde la fluorescence verte de la protéine GFP-HELZ2 α ou β et la troisième, en bleu, le marquage nucléaire avec l'intercalant de l'ADN (DAPI). La quatrième image à droite est la superposition des 3 premières images réalisée avec le logiciel ImageJ. Grâce au DAPI, le signal rouge du DyLight® 549 a été identifié comme étant toujours dans le noyau cellulaire, cependant, il n'est pas présent dans la totalité de ce compartiment puisque certaines zones ne sont pas marquées (Figure 39). Ces résultats correspondent avec ceux retrouvés dans la littérature, à savoir que la protéine THRAP3 est localisée dans le noyau mais pas dans les nucléoles (K.-M. Lee, Hsu, et Tarn 2010). En ce qui concerne GFP-HELZ2 α deux profils ont été observés, 95% des

cellules présentent un signal uniquement dans leur cytoplasme tandis qu'une minorité de cellules, environ 5%, présentent un signal à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, à l'exception des nucléoles. Des résultats similaires ont été obtenus en transfectant les plasmides codant pour les protéines GFP-HELZ2 β et HA-THRAP3.

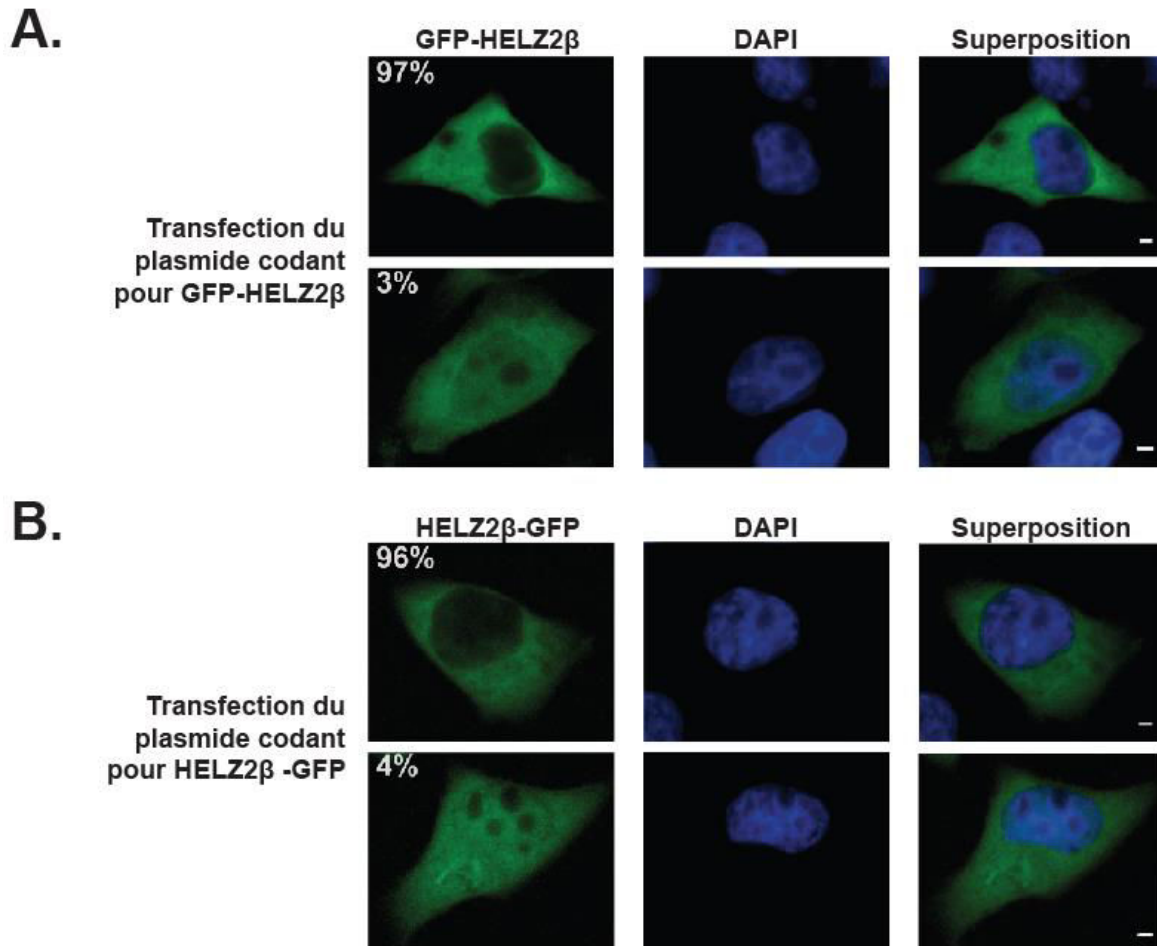


Figure 40 : Influence de la position de l'étiquette sur la localisation intra-cellulaire. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant pour GFP-HELZ2 β (en haut) ou HELZ2 β -GFP (en bas). Un marquage au DAPI permet de visualiser l'ADN en bleu (2^{ème} image). La GFP des protéines de fusion a été observée par fluorescence directe (2^{ème} image). La 3^{ème} image correspond à la superposition des trois premières. Afin de connaître le pourcentage de cellules possédant chaque profil, 400 cellules ont été comptées. Le pourcentage de cellules compté est noté en haut à gauche de la case correspondante. Barre d'échelle = 1 μ m

3.3.1.2 Influence de la position de l'étiquette GFP

Afin de contrôler si la position en N-terminale de l'étiquette GFP ne gêne pas l'import de la protéine dans le noyau, une nouvelle construction avec l'étiquette GFP en C-terminale a été réalisée. Les plasmides codants pour HELZ2 β où l'étiquette GFP est

fusionnée à l'extrémité N-terminale (GFP-HELZ2 β) ou C-terminale (HELZ2 β -GFP) ont été transfectés dans des cellules HeLa. Après fixation, le même résultat a été observé avec la GFP en N-terminal et en C-terminal, à savoir la présence de HELZ2 β -GFP dans le cytoplasme pour, respectivement, 97 et 96% des cellules et dans le noyau et le cytoplasme pour le pourcentage de cellules restant (Figure 40).

3.3.2 Test de différents anticorps commerciaux anti-HELZ2

Dans les expériences précédentes, des protéines étiquetées surexprimées ont été utilisées, cependant ces étiquettes ainsi que la surexpression peuvent modifier le rôle de HELZ2 *in cellulo*. Afin d'étudier la protéine endogène il est nécessaire d'utiliser un anticorps dirigé contre celle-ci, un anticorps commercial a donc été commandé. Afin de vérifier qu'il reconnaisse correctement les 2 isoformes, j'ai transfecté des cellules HEK293 avec les plasmides codant pour GFP-HELZ2 α ou β . Une immunoprécipitation avec les billes GFP-Trap_A a été réalisée et les différents échantillons ont été analysés par western blot et révélés avec un anticorps commercial dirigé contre HELZ2 (Figure 41).

On observe qu'une bande est présente entre 130 kDa et 250 kDa dans toutes les protéines totales. La taille à laquelle cette bande a migré peut correspondre à l'isoforme α (230 kDa) de la protéine HELZ2 endogène. De multiples bandes d'intensités plus faibles et migrant à une distance correspondant à des protéines de plus petites tailles sont observés dans les fractions totales. Ces bandes correspondent soit à des produits de dégradation de HELZ2 soit à d'autres protéines reconnues de façon non-spécifique par l'anticorps. On observe aussi des bandes dans les fractions immunoprécipitées qui correspondent aux protéines de fusion GFP-HELZ2 α (à gauche) et GFP-HELZ2 β (à droite). Dans les fractions immunoprécipitées, on n'observe qu'une seule bande correspondant à la protéine étiquetée démontrant la spécificité de l'immunoprécipitation puisque les protéines HELZ2 endogènes sont absentes.

Ce résultat nous montre que l'anticorps utilisé est capable de reconnaître les deux isoformes de la protéine d'intérêt.

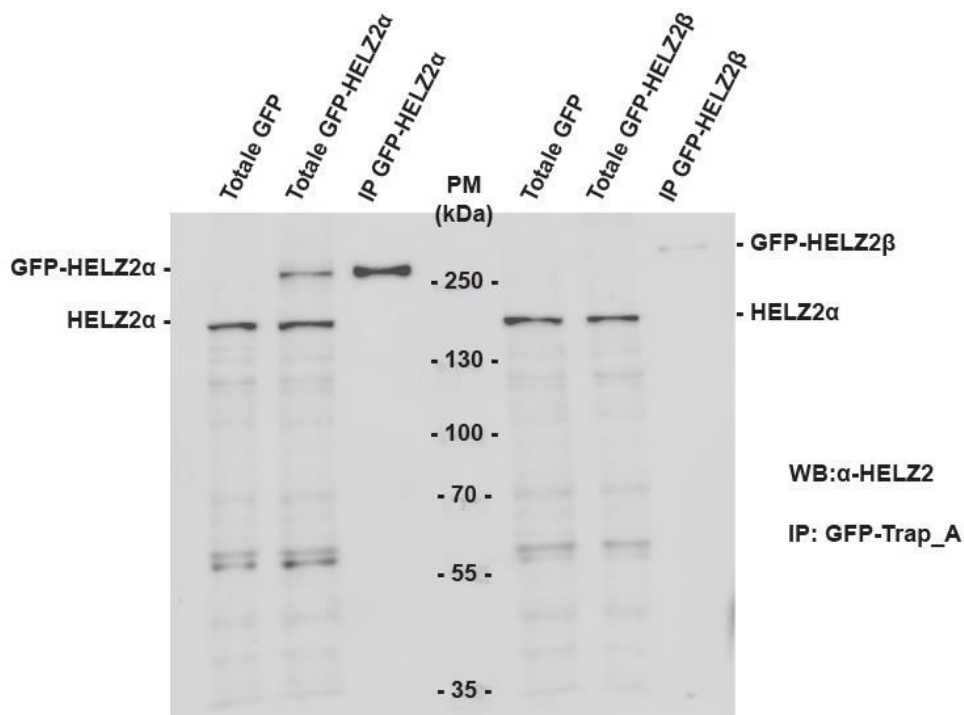


Figure 41 : Test de reconnaissance des anticorps commerciaux des protéines GFP-HELZ2 et HELZ2 endogène. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides codant pour la GFP, GFP-HELZ2α ou β. Les protéines ont été immunoprécipitées avec les billes GFP-Trap_A. Les échantillons ont été analysés sur un western blot révélé avec l'anticorps anti-HELZ2 (orb126276). Les échantillons transfectés avec GFP-HELZ2α ont été déposés à gauche et ceux avec β à droite.

3.3.3 Expression endogène de HELZ2

Cette expérience a pour but d'identifier le meilleur modèle cellulaire pour l'étude de la protéine HELZ2 *in cellulo*. Pour cela j'ai cherché à identifier une lignée cellulaire exprimant de façon endogène au moins l'une des isoformes de la protéine HELZ2 endogène. Un second objectif était d'étudier s'il existe une modification du niveau d'expression de HELZ2 dans certains cancers. Pour ceci, plusieurs lignées cellulaires ont été décongelées, lavées et directement lysées. Les concentrations protéiques de tous les échantillons ont été ajustées puis les échantillons ont été déposés sur un SDS-PAGE 8%. Un western blot révélé avec un anticorps anti-HELZ2 a été réalisé (Figure 42). De plus, ce test a été l'occasion de comparer des lignées cancéreuses à des lignées issues du même tissu mais non-cancéreuses.

Les résultats obtenus montrent que HELZ2α est présent dans la majorité des lignées testées, tandis que l'isoforme β n'est que visible dans les lignées HeLa, HEK293 et Huh7. On note cependant que certaines lignées cancéreuses expriment HELZ2α qu'en quantité très faible comme les lignées RL, U-937 ou MCF7.

En effet, la lignée cellulaire non-cancéreuse de sein MCF10A a un niveau d'expression de HELZ2 α plus de six fois supérieur par rapport à son homologue cancéreuse (MCF7). On remarque un résultat similaire pour les deux lignées de lymphocytes B.

Ces résultats sont différents des niveaux d'expressions des ARNm de HELZ2 observés dans la banque de donnée www.proteinatlas.org, où les niveaux d'expression de HELZ2 dans les cellules HEK293 et HeLa sont inférieurs à celui des MCF7. Cependant, aucune banque de données ne recense l'expression protéique de HELZ2 dans des lignées cellulaires.

La quantité de protéines dans chaque extrait a été dosée afin de déposer la même quantité pour chaque lignée. Cependant, les niveaux d'expression de la tubuline varient légèrement entre les différentes lignées puisque ce sont des types cellulaires très différents ce qui n'en fait pas un bon contrôle pour ce type de western blot.

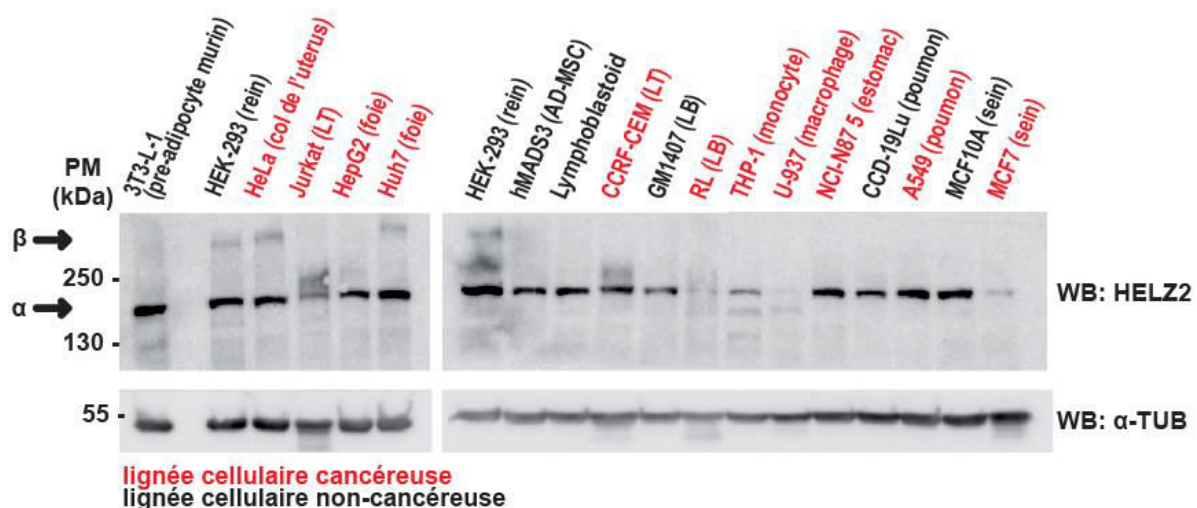


Figure 42 : Niveau d'expression des deux isoformes protéiques de HELZ2. Western-blot de lysats de différentes lignées cellulaires cancéreuses (rouge) ou non (noir). En haut, un anticorps commercial dirigé contre HELZ2 a été utilisé et en bas, un anticorps anti-tubuline est utilisé comme contrôle de charge. A gauche, la taille estimée des deux isoformes de HELZ2 est indiquée par des flèches. LT=lymphocyte T ; LB= lymphocyte B

Suite à la nette différence d'expression de HELZ2 entre la lignée saine MCF10A et son homologue cancéreuse MCF7, un western-blot avec de nombreuses lignées de cellulaires provenant de cancers de sein a été réalisé (types basal, HER2+, luminal A et luminal B). Aucune corrélation entre la malignité du type de cancer et le niveau d'expression de HELZ2 n'a été observée (figure non-montrée). Cependant, les

différences observées entre ces lignées sont intéressantes car de nombreuses données montrent que le métabolisme des lipides ainsi que les adipocytes jouent un rôle primordial dans certains cancers du sein. Pour approfondir ceci il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de HELZ2 dans des tissus périphériques aux cancers du sein.

3.3.4 Etude de l'expression de HELZ2 durant la différenciation de cellules souches dérivées du tissu adipeux

3.3.4.1 Adipogenèse

Les données publiées sur HELZ2 lient cette protéine au métabolisme et plus précisément au stockage des lipides (Yoshino et al. 2014; Katano-Toki et al. 2013). Par conséquent, pour étudier son rôle *in cellulo* des cellules souches dérivées de tissu adipeux, la lignée hMADS3 (human multipotent adipose-derived stem cells) ont été choisies. Ces cellules ont été isolées à partir de déchets opératoires de tissu adipeux de jeunes enfants. Elles possèdent un caryotype diploïde normal et sont capables de proliférer *ex vivo*. Elles sont aussi capables de se différencier en adipocytes, en chondrocyte ou en ostéoblaste en fonction du milieu de culture (Rodriguez et al. 2004). La première partie de mon travail a consisté à mettre au point les conditions de différenciation. Le protocole de différenciation en adipocyte dure 17 jours. Le facteur de croissance FGF2 est présent dans le milieu jusqu'à un jour après confluence, puis le FGF2 est retiré pendant 24h. La différenciation est donc initiée deux jours après confluence. Cette différenciation est induite à l'aide d'un cocktail de produits décrit en 2.7.1 (Figure 22) (Elabd et al. 2009; Pisani et al. 2011).

Après induction de la différenciation, un marquage des lipides à l'Oil Red O à plusieurs stades a permis de suivre son évolution (

Figure 43B). On observe sur les photos, ainsi que les images prises avec un microscope optique inversé, que la coloration rouge des lipides par l'Oil Red O augmente durant la différenciation. Sur les grossissements, on observe clairement les gouttelettes lipidiques présentes dans les cellules. Après avoir pris les photos le colorant a été extrait des cellules et l'absorbance (DO) a été mesurée à 492nm. On observe que l'absorbance passe de 0,152 avant la différenciation à 2,683 en fin de différenciation.

Des échantillons protéiques ont également été récupérés afin de réaliser un western-blot (

Figure 43C). Les bandes détectées sur la membrane après coloration au ponceau servent de contrôle de charge puisque les protéines de ménage habituellement utilisées comme standards varient durant la différenciation. Le western blot a été révélé avec un anticorps anti-PPAR γ qui apparaît après 8 jours de différenciation et augmente jusqu'à la fin. Le marquage des lipides et l'apparition de PPAR γ suivi de son augmentation progressive démontrent que la différenciation s'est bien déroulée. Le western blot a aussi été révélé avec l'anticorps dirigé contre HELZ2 utilisé précédemment. On observe que l'isoforme α de HELZ2 est très présent à l'état indifférencié (J0) puis disparaît rapidement avant de réapparaître faiblement à partir du dixième jour. Au vu de ces résultats, afin de vérifier un possible rôle de HELZ2 dans le maintien à l'état indifférencié, j'ai mis au point les différenciations de ces mêmes cellules hMADS en chondrocytes et ostéoblastes.

3.3.4.2 Ostéogenèse et chondrogenèse

Pour l'ostéogenèse le protocole de différenciation est décrit en 0 (Figure 23) (Rotger et al. 2011). Un marquage à l'Alizarin red a été effectué pour contrôler la différenciation (

Figure 43D). On observe qu'au jour 17, de nombreux dépôts calciques sont colorés en rouge par l'Alizarin red montrant l'efficacité de la différenciation. Des échantillons protéiques ont été prélevés durant la différenciation. Un western blot a été réalisé et révélé avec l'anticorps anti-HELZ2. Un profil d'expression similaire à la différenciation en adipocyte a été obtenu puisque HELZ2 α disparaît après deux jours de différenciation.

Pour la chondrogenèse le protocole est décrit en 2.7.3 (Figure 24) (Roux et al. 2013). Un marquage au bleu Alcian permet de contrôler la différenciation en colorant les polysaccharides sécrétés par les chondrocytes (

Figure 43E).

On observe qu'au jour 21, de nombreux dépôts de glycosaminoglycanes sont colorés en bleu montrant l'efficacité de la différenciation. Des échantillons protéiques ont été prélevés durant la différenciation. Un western blot a été réalisé et révélé avec l'anticorps anti-HELZ2. Dans ce cas, l'isoforme alpha il ne disparaît pas et on note

aussi l'apparition d'une bande d'un poids moléculaire supérieur à 250kDa qui pourrait correspondre à l'isoforme beta.

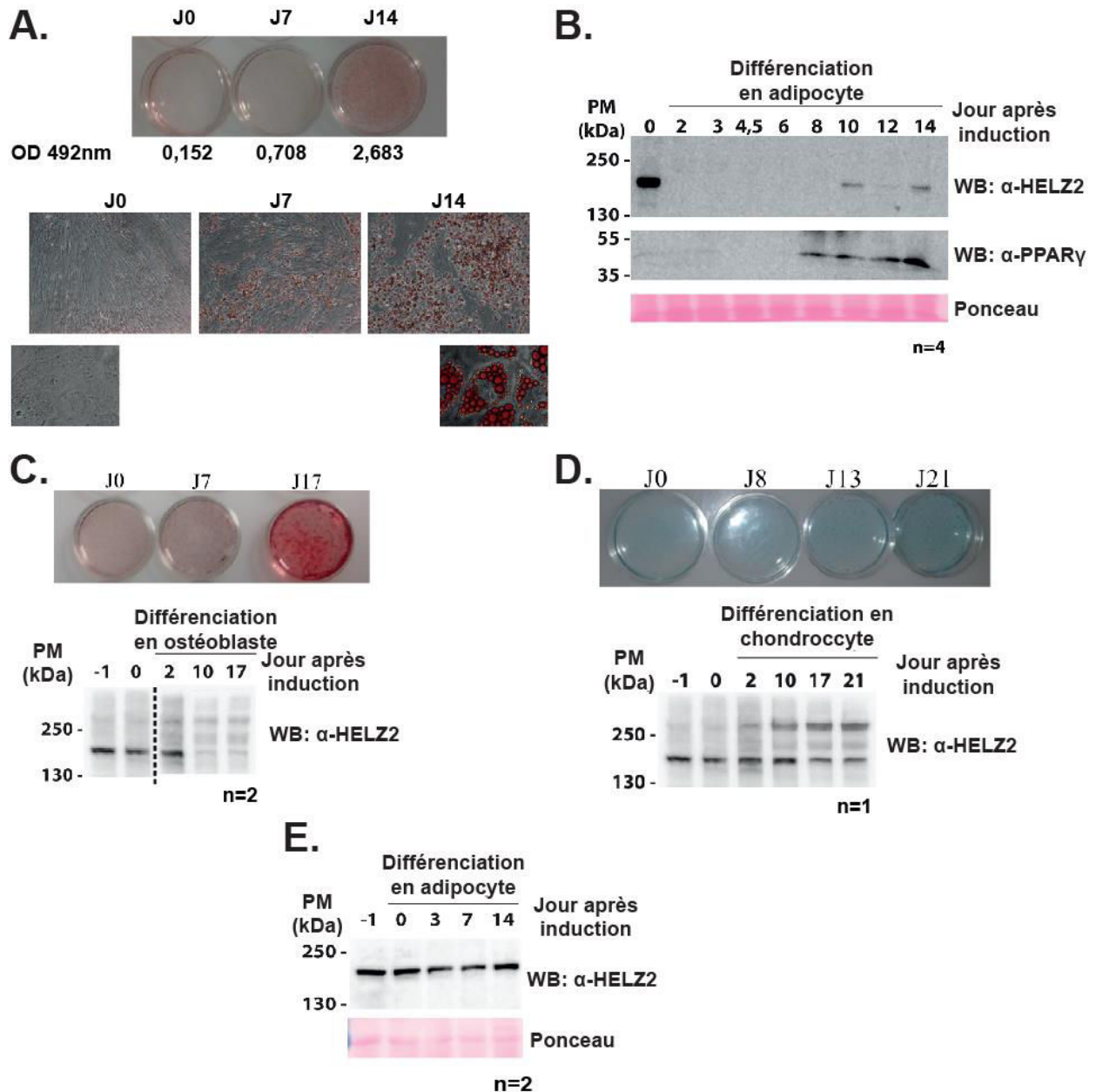


Figure 43 : Etude de l'implication de HELZ2 dans la différenciation des cellules hMADS. A) Photographie et images de microscopie optique à contraste de phase après fixation et coloration des gouttellettes lipidiques à l'Oil Red O. Après les clichés réalisés, les cellules ont été lysées et le colorant extrait avec de l'isopropanol contenant 4% de NP40. L'absorbance à 492nm a été mesurée pour évaluer l'efficacité de la différenciation. B) Western blot montrant le devenir de HELZ2 et PPARγ durant la différenciation en adipocytes. Le Ponceau sert de contrôle de charge. C) Photographie et western blot montrant le devenir de HELZ2 durant la différenciation en ostéoblastes. Après fixation, les dépôts calciques ont été marqués à l'Alizarin Red. D) Photographie et western blot montrant le devenir de HELZ2 durant la

différenciation en chondrocytes. Après fixation, les glycosaminoglycanes ont été marqués au bleu Alcian. E) Western blot montrant les devenir de HELZ2 durant la différenciation en adipocytes du second lot de cellules hMADS. Le Ponceau sert de contrôle de charge.

L'étude des effets d'un KO ou d'une surexpression de HELZ2 dans les cellules hMADS pourrait permettre d'étudier le rôle de HELZ2 *in cellulo*. Ceci nécessite d'introduire de l'ADN exogène comme des plasmides dans les cellules hMADS. Dans ce but, en parallèle, des différenciations, des tests de transfections avec un plasmide codant pour la GFP ont été entrepris. Plusieurs réactifs et protocoles de transfections ont été testés. Dans tous les cas, une grande mortalité des cellules a été observée et moins d'un pourcent des cellules exprimait la GFP après analyse par microscopie à épifluorescence.

L'électroporation a ensuite été testée en utilisant le kit « Human MSC Kit buffer », référence VPE-1001, Amaxa Biosciences avec les programmes U-23 et C-17 du Nucleofector™ de Lonza comme décrit par Zaragosi et ses collègues (Zaragosi et al. 2007). La nucléofection contrôlée avec le plasmide pmaxGFP inclus dans le kit a permis d'obtenir des cellules exprimant la GFP malgré un fort taux de mort cellulaire. Cependant, l'utilisation des plasmides pEGFP-C1 et pEGFP-C1-HELZ2 a conduit à la mort de toutes les cellules.

Le stock du lot de cellules utilisé pour les expériences précédentes arrivant à épuisement, un autre lot des cellules hMADS3 a été testé pour la différenciation en adipocytes. La coloration à l'Oil Red O ainsi que l'absorbance étant similaires (non-montrés), on a observé que les deux lots de cellules se différencient avec une efficacité équivalente. Un western blot a été réalisé avec des échantillons prélevés durant la différenciation du second lot de cellules. Il a été révélé avec l'anticorps dirigé contre HELZ2 (

Figure 43F). Les bandes détectées sur la membrane après coloration au ponceau servent de contrôle de charge puisque les protéines de ménage habituellement utilisées comme standards varient durant la différenciation. Comme pour le premier lot, on observe que HELZ2 α est toujours présent avant la différenciation. Cependant cette protéine ne disparaît pas durant la différenciation du second lot de cellules.

Puisque les résultats du devenir de HELZ2 durant les différenciations ne semblent pas être reproductibles sur les cellules hMADS3 et que l'introduction de plasmides dans ces dernières est très compliquée, il a été décidé d'abandonner les recherches sur ce

type cellulaire. Pour étudier le rôle *in vivo* de HELZ2, il a été décidé d'utiliser les cellules HEK293 puisqu'elles semblent exprimer les deux isoformes et qu'elles sont facilement transfectables.

3.3.5 Tentative de création d'une lignée HELZ2 KO par la méthode CRISPR/Cas9

3.3.5.1 En ciblant le premier exon commun des deux isoformes

L'un des objectifs de cette étude étant l'identification des ARN cibles de HELZ2 et plus particulièrement de son domaine RNB. La méthode qui a été retenue est la création d'une lignée cellulaire Knock-out pour le gène HELZ2 suivi d'une analyse différentielle du transcriptome de la lignée KO par rapport à la lignée sauvage. Le modèle utilisé est la lignée cellulaire HEK293. La première stratégie mise en place a été de cibler le premier exon commun des deux isoformes en utilisant la méthode de CRISPR/Cas9 (stratégie n°1 Figure 44A). Plusieurs ARN guides ont été dessinés, certains en utilisant des outils online et d'autres « à la main ». Les séquences d'ADN qui seront transcrites en la partie variable des ARNg ont été produites puis insérées dans le plasmide Px330-T2A-GFP. Ce plasmide code pour l'ARNg mais aussi la protéine Cas9-GFP modifié pour comporter des codons optimisés pour une expression humaine (hCOCAS9-GFP). Deux jours après transfection, les cellules GFP positives (GFP+) ont été triées et isolées par FACS par la plateforme de cytométrie en flux de l'institut. Une partie des cellules GFP+ a été lysée avec le kit DirectPCR Lysis Reagent (Tail) de la société Viagen Biotech afin d'en extraire l'ADN. Une PCR de la région du premier exon commun a ensuite été réalisée. Afin d'étudier l'efficacité de la coupure de l'ADN génomique un test T7 endonucléase a été réalisé (cf 2.2.4) (Figure 44B). Comme attendu, on observe une seule bande dans l'échantillon où l'ADN sauvage (WT) a été digéré. Aucune bande supplémentaire n'est visible lorsque l'ARNg F (sgF) a été utilisé. En présence des ARNg D, E, G et I on observe à chaque fois deux bandes de taille inférieure signifiant qu'un remaniement de l'ADN a eu lieu, cependant le pourcentage de remaniement est faible. Les clones isolés ont été amplifiés, récupérés et enfin lysés. Un western blot a été réalisé avec les lysats de chaque clone (Figure 44C). L'anticorps capable de détecter HELZ2 endogène testé en 3.3.2 a été utilisé. On observe une bande correspondant à HELZ2 α dans le contrôle où un échantillon sauvage a été déposé. On observe que tous les échantillons testés possèdent la même bande à une intensité similaire. On en conclue qu'aucun des clones obtenus ne possède de mutation non-sens ou induisant un décalage de la phase de lecture. Ceci peut être dû

au faible pourcentage ou bien un événement de mutation a eu lieu. L'hypothèse avancée a été que cette région génomique n'est peut-être que peu accessible pour la Cas9.

3.3.5.2 En excisant un exon

Une autre méthode a donc été mise en place. Au lieu de cibler le premier exon commun, deux ARNg ciblant les introns de chaque côté du second exon seront utilisés simultanément. Ceci a pour but d'exciser cet exon et, après réparation, de créer ainsi un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon stop précoce.

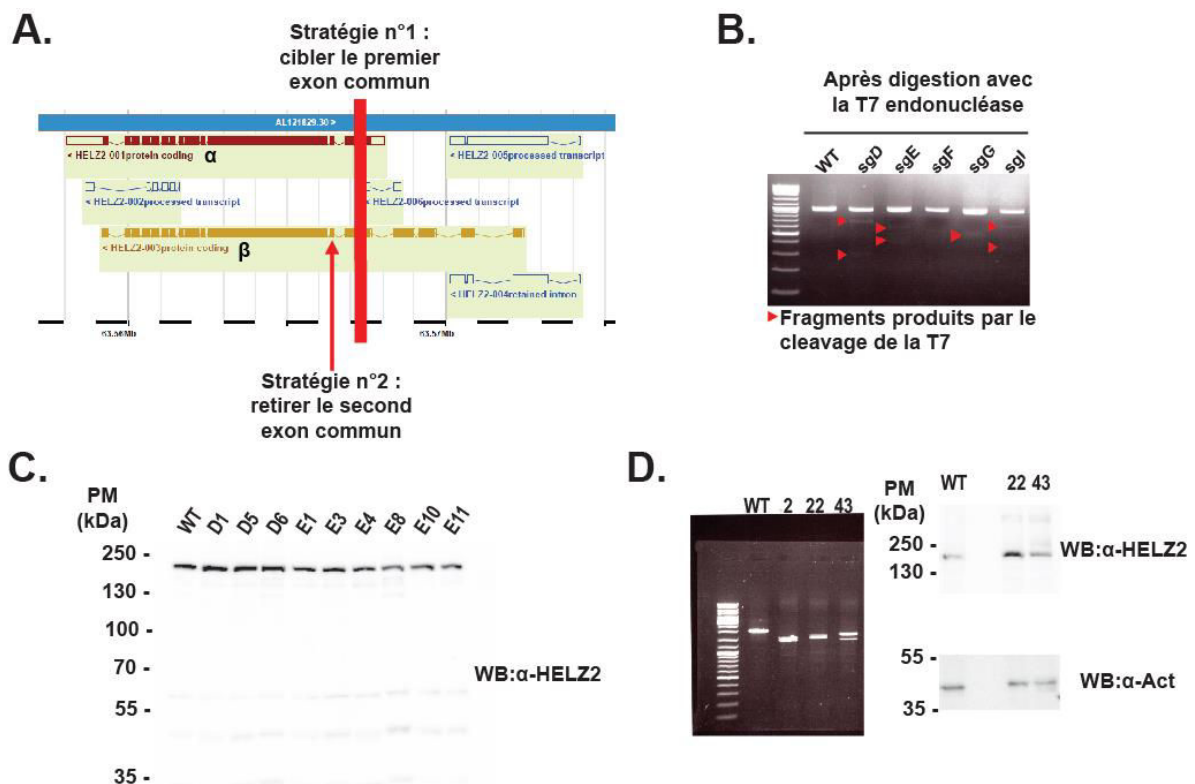


Figure 44 : Knock-out du gène HELZ2 par CRISPR/Cas9. A) Schéma de la région génomique de HELZ2 montrant l'isoforme α en rouge et β en jaune. Le gène se trouve sur le brin non-codant. La région ciblée par la première stratégie a été marquée par un trait rouge. La seconde stratégie consiste à exciser le second exon commun qui est indiqué par la flèche rouge. Les cellules GFP⁺ ont été triées et isolées par FACS. Une PCR visant à amplifier la région d'intérêt a été réalisée sur l'ADN extrait d'une partie des cellules. L'efficacité de coupure par la Cas9 a été évaluée à l'aide du test endonucléase T7 (cf matériel et méthodes). Le résultat a été déposé sur un gel d'agarose marqué au BET (B). Après expansion des colonies, les protéines extraites puis analysées sur un western blot révélé avec l'anticorps anti-HELZ2 (C). Pour la seconde stratégie, des plasmides codant pour la Cas9, la GFP et deux ARNg ciblant les introns de part et d'autre du second exon commun ont été transfectés dans des HEK293. Les cellules GFP⁺ ont été triées et isolées par FACS. Après expansion, les clones ont été

récoltés et une partie des cellules a été lysée afin d'en extraire l'ADN. Une PCR visant à amplifier la région d'intérêt a été réalisée et a été déposée sur un gel d'agarose marqué au BET (D gauche). Les protéines ont été extraites des clones comportant un profil différent du sauvage et un western blot révélatrice avec l'anticorps anti-HELZ2 a été réalisé (D droite).

Des plasmides codant pour trois paires d'ARNg ont été construits et transfectés dans des cellules HEK293. Après amplification, les clones ont été récoltés et une partie des cellules a été lysée afin d'en extraire l'ADN. Une PCR visant à amplifier la région d'intérêt a été réalisée. Les clones comportant un profil différent du sauvage ont été sélectionnés pour être amplifiés (Figure 44D gauche). Le clone numéro 2 n'a pas pu être amplifié. Les clones 22 et 43 ont été amplifiés afin d'extraire leurs protéines. Un western blot a été réalisé afin d'observer le niveau d'expression de HELZ2. On observe que la bande présente dans l'échantillon sauvage qui correspond à HELZ2 α est aussi présente dans les deux clones présentant un remaniement de l'ADN. On en conclut qu'aucun de ces clones n'est KO pour HELZ2.

Plusieurs hypothèses expliquant le fait qu'aucun clone KO pour HELZ2 n'a pu être identifié. Premièrement, il est possible que la bande détectée par l'anticorps anti-HELZ2 ne soit pas la protéine HELZ2. Cependant, le fait que deux autres anticorps dirigés contre HELZ2 (orb162478 de Biorbyt[®] et ab129781 de Abcam[®] identique à celui utilisé par (Fusco et al. 2017) pour valider l'inhibition par ARNi) ont été testés et reconnaissent également une bande de taille identique. Ceci tend à invalider l'hypothèse précédente. Deuxièmement, malgré le fait que les souris HELZ2 KO sont viables (Yoshino et al. 2014), il est possible que HELZ2 soit essentiel dans les cellules humaines HEK293. Il est aussi possible que les cellules HELZ2 KO soient viables mais qu'elles se divisent plus lentement que les cellules sauvages, et qui ne sont donc pas sélectionnées après l'étape d'amplification cellulaire dans les plaques 96 puits. Une dernière possibilité, est que le nombre de clones testés n'était pas assez élevé.

[3.3.6 Recherche de partenaires protéiques de GFP-HELZ2](#)

[3.3.6.1 Analyse par spectrométrie de masse](#)

Afin de mieux comprendre le rôle de HELZ2 dans la cellule il est important de connaître ses partenaires protéiques. Pour ce faire, les plasmides codant pour les protéines GFP, GFP-HELZ2 α et β ont été transfectés dans des cellules HEK293. Une purification à grande échelle a été réalisée avec les billes d'agarose GFP-Trap_A. Après lavages, une élution a été réalisée avec de la glycine pH2,5. Un western blot a été réalisé avec

5% des protéines afin d'identifier les fractions contenant HELZ2 (figure non-montrée). Les fractions d'éluion contenant HELZ2 ont été rassemblées et déposées sur un gel gradient 5-20% d'acrylamide. Après coloration à l'argent, il a été observé que de nombreuses protéines étaient présentes dans le contrôle GFP seule (figure non-montrée). Les lavages ont été optimisés et les billes GFP-Trap_MA ont été utilisées. Ces billes permettent des lavages de meilleure efficacité. Une nouvelle purification a été réalisée avec les nouveaux paramètres et les échantillons ont été déposés sur un gel gradient d'acrylamide puis coloré à l'argent (Figure 45A). On observe des bandes présentes dans GFP-HELZ2 α et β mais absentes du contrôle GFP seul. Ces bandes ont été découpées puis analysées par spectrométrie de masse. Les résultats des bandes 1 à 4 n'ont montré que des kératines. Les bandes 5 et 6 correspondent respectivement à GFP-HELZ2 α et β . Les tableaux des résultats de cette analyse sont présentés en annexe.

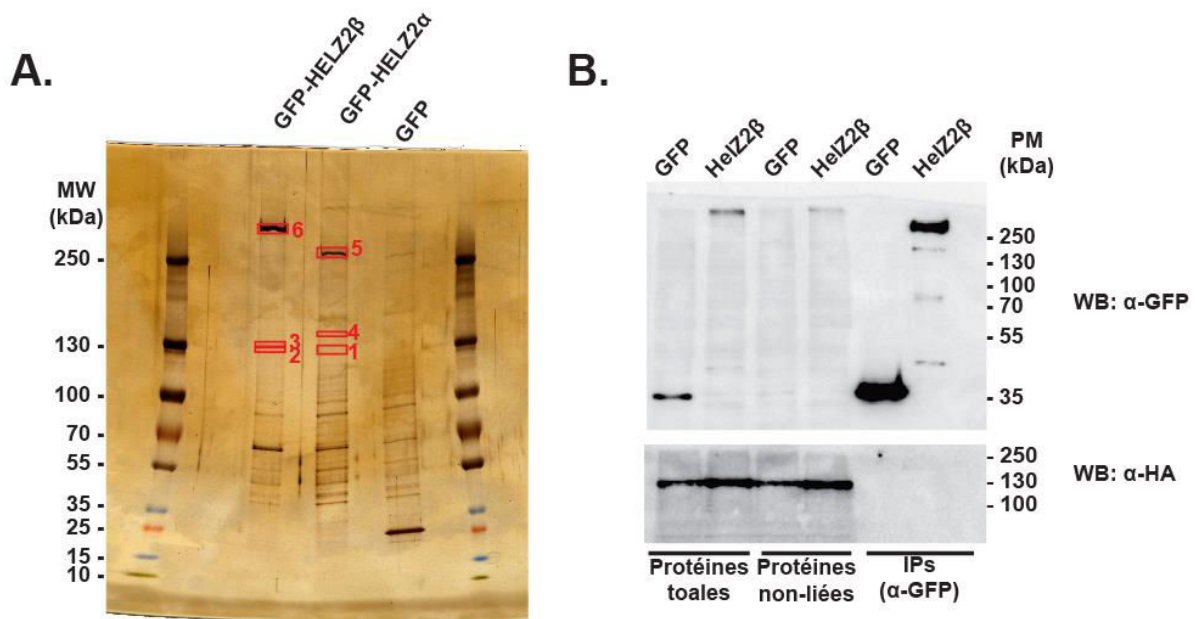


Figure 45 : identification de partenaires protéiques de HELZ2 : A) Une purification à grande échelle des protéine GFP-HELZ2 a été réalisée après expression dans les cellules HEK293. Les billes GFP-Trap_MA ont été utilisées. Les protéines ont été éluées puis les échantillons ont été fractionnés sur un gel d'acrylamide 5-20% qui a ensuite été coloré à l'argent. Les bandes marquées 1 à 5 ont été analysées par spectrométrie de masse. B) Expérience de co-immunoprécipitation de GFP-HELZ2 β et HA-THRAP3. Les billes GFP-Trap_A ont été utilisées. Les fractions totales, non-liées et immunoprécipitées ont été analysées par western blot révélé avec les anticorps anti-GFP et anti-HA (n=1).

3.3.6.2 Co-IP THRAP3

Dans la littérature il a été reporté que HELZ2 interagit avec la protéine nucléaire THRAP3 (Katano-Toki et al. 2013). Afin d'étudier si cette interaction peut être retrouvée dans le système utilisé, des plasmides codant pour HA-THRAP3 et GFP-HELZ2 β ont été transfectés dans des HEK293. Une immunoprécipitation avec les billes GFP-Trap a été effectuée. Un western blot a été réalisé avec les différentes fractions et a été révélé avec des anticorps anti-GFP et anti-HA (Figure 45B). On observe que dans la fraction de protéines totales, les protéines GFP, GFP-HELZ2 β et HA-THRAP3 sont présentes. Dans les protéines immunoprécipitées on retrouve la GFP et GFP-HELZ2 β . En revanche la protéine HA-THRAP3 en est totalement absente et la totalité de cette protéine est retrouvée dans la fraction non liée. Ce résultat est en accord avec la différence de localisation entre les deux protéines observée dans le chapitre 3.3.1.1.

4. Discussion et perspectives

4 Discussion et perspectives

4.1 HELZ2 est une protéine de grande taille possédant deux activités enzymatiques

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse est spécialisé dans l'étude des protéines impliquées dans le métabolisme des ARN. Nous nous sommes intéressés à la protéine HELZ2 car, par analyse de sa séquence protéique, plusieurs domaines caractéristiques de ce type de protéines ont pu être identifiés :

Un doigt de zinc de type C2H2 (Cx2Cx12Hx5H), similaire à ceux retrouvés dans les protéines JAZ où ils sont connus pour lier l'ARN double brin ainsi qu'un second doigt de zinc de type CCCH (Cx5-10Cx4-6Cx3H), connus pour lier l'ARN ;

Deux domaines hélicase de type SF1 appartenant à la sous-famille Upf1-like ;

Enfin, un domaine RNB responsable d'une activité exoribonucléase 3'-5' au centre de la protéine HELZ2.

Les doigts de zinc à ARN associés à un domaine hélicase de ce type rappelle l'organisation de la protéine UPF1 impliquée, entre autres, dans de nombreux mécanismes de contrôle de qualité des ARN. Quant au domaine RNB il est présent dans les protéines DIS3 et DIS3L1 qui sont les sous-unité catalytiques de l'exosome, complexe majeur de dégradation des ARN (Reis et al. 2013). Ce domaine est aussi retrouvé au sein de la protéine DIS3L2 dégradant les ARN uridylés dans une voie de dégradation découverte en 2016 (Łabno, Tomecki, et Dziembowski 2016; Pirouz et al. 2016; Ustianenko et al. 2016). L'association d'un domaine RNB avec des domaines hélicases est inédite, ce qui rend l'étude de HELZ2 particulièrement intéressante.

Les domaines décrits ci-dessus sont très conservés chez les vertébrés ce qui semble impliquer la conservation des activités des différents domaines de HELZ2 chez ces derniers. Bien que HELZ2 soit aussi présente chez les mollusques, elle est moins conservée chez ces organismes.

Avant cette étude, la fonction d'aucun des domaines ci-dessus n'avait été testée et il n'existait presque aucune donnée sur ses caractéristiques biochimiques. Seuls les 5 potentiels motifs LxxLL (Surapureddi et al. 2002) avaient été étudiés. Ces motifs semblent ne pas être actifs puisqu'ils ne sont pas responsables de l'interaction avec les récepteurs PPAR (Tomaru et al. 2006).

Durant ma thèse, j'ai cherché à caractériser biochimiquement HELZ2 et à vérifier l'activité des différents domaines. Pour ce faire, j'ai mis en œuvre deux stratégies afin de produire une protéine recombinante. La production bactérienne étant trop improbable du fait de la taille importante de la protéine, j'ai dans un premier temps réalisé les clonages afin de produire un baculovirus permettant de produire la protéine étiquetée 3xflag-HELZ2 β -TwinStrep dans des cellules d'insectes. Ce système est préférable à l'expression bactérienne pour les protéines de haut poids moléculaire (Jarvis 2009). J'ai pu démontrer que la protéine est produite. Cependant malgré l'utilisation de la sonication, de différents détergents ainsi que d'une forte concentration en sel, il m'a été impossible de solubiliser la protéine. Plusieurs hypothèses sont probables, par exemple, il est possible que la protéine recombinante ne soit pas repliée de manière optimale entraînant son insolubilité. Il est aussi possible que son insolubilité soit due à l'absence d'un partenaire protéique dans les cellules d'insectes. Il aurait également été possible de modifier le pH du tampon de lyse et/ou en y ajoutant une quantité faible d'urée pour solubiliser la protéine (C. Wang et al. 2008; Okumura et al. 2006). Néanmoins cela aurait pu dénaturer la protéine et compromettre son analyse biochimique. De plus par immunomarquage, j'ai pu démontrer que la protéine est située dans le cytoplasme des cellules d'insectes. L'absence d'ADN libre dans le cytoplasme suggère donc que l'insolubilité de la protéine recombinante n'est pas due à une liaison à l'ADN. Cependant, il est possible que l'ADN entre en contact avec la protéine lors de la lyse entraînant sa précipitation. Afin de rendre la protéine soluble, l'introduction de mutations aurait peut-être solubilisé la protéine. Dans mon cas, ceci n'était pas une solution envisageable puisque mon but était d'obtenir une protéine totalement fonctionnelle afin d'étudier ses activités et que ces mutations auraient pu les abolir ou les modifier. Cependant, cela aurait pu être utilisé pour étudier la structure de HELZ2 par exemple. La production de protéines tronquées pourrait aussi être envisagée.

La protéine produite dans les cellules d'insectes étant inutilisable je me suis tourné vers la production de protéine GFP-HELZ2 dans les cellules humaines HEK293. Il est à noter que les insectes tels que la drosophile ne possèdent pas d'homologue d'HELZ2 mais expriment seulement une protéine avec une organisation partiellement similaire à HELZ2 avec les deux doigts de zinc et un domaine hélicase (gène CG9425). Les

cellules humaines peuvent donc être un meilleur hôte pour l'expression de HELZ2 car les conditions rencontrées seront les conditions naturelles. De plus, si des partenaires sont nécessaires à sa solubilité, ils seront vraisemblablement présents. Par ailleurs, l'utilisation de transfections transitoires permet d'éviter les potentiels effets toxiques de la surexpression de HELZ2.

Les protéines sont immunoprécipitées grâce à des billes portant la fraction variable de l'unique chaîne d'anticorps d'alpagas. Cette particularité m'a permis d'utiliser les protéines directement sur billes. Les immunoprécipitations réalisées m'ont permis de purifier suffisamment les protéines afin de réaliser des tests d'activité ATPase, nucléase et de fixation aux acides nucléiques.

4.1.1 HELZ2 est majoritairement cytoplasmique

Grâce à la propriété fluorescente de la GFP j'ai pu facilement localiser les protéines de fusion GFP-HELZ2 et HELZ2-GFP. L'une des limitations de l'utilisation d'une étiquette GFP est la possible interférence avec des signaux d'import ou d'export du noyau. Pour éviter ces interférences j'ai réalisé deux fusions avec lesquelles j'ai observé le même résultat. Effectivement, j'ai ainsi pu montrer que, dans les cellules HeLa, ces protéines de fusion sont uniquement localisées dans le cytoplasme dans 95% des cellules. Cependant, dans 5% des cellules on observe HELZ2 dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau à l'exception des nucléoles. L'une des hypothèses possible est que HELZ2 soit présente dans le noyau uniquement à un moment précis du cycle cellulaire. Cette hypothèse pourrait être testée en synchronisant les cellules à l'aide d'un composé chimique arrêtant le cycle cellulaire à un stade précis (Banfalvi 2011).

Dans la littérature, une surexpression de HELZ2 α -flag et de PPAR α dans des cellules HEK293 a été réalisée (Surapureddi et al. 2002). Avec cette méthode, les auteurs ont décrit HELZ2 comme étant nucléaire. Plus récemment, la localisation des deux isoformes de HELZ2 a été étudiée par western blot après fractionnement subcellulaire des cellules hépatiques Huh7.5.1 (Fusco et al. 2017). De cette manière, les deux isoformes de HELZ2 ont été montrées comme majoritairement cytoplasmique, mais elles sont aussi présentes dans les fractions membranaire et nucléaire. Des résultats contradictoires sont donc présents, cependant, le dernier résultat publié (Fusco et al. 2017) ainsi que les résultats obtenus lors de ma thèse avec l'étude des protéines étiquetées GFP montrent que HELZ2 est majoritairement cytoplasmique.

Dans l'étude de Fusco et ses collègues (Fusco et al. 2017), il a aussi été montré que la fraction nucléaire de HELZ2 augmente après induction à l'IFN- α (Fusco et al. 2017). Cela permet de supposer que la co-expression PPAR α avec HELZ2 a entraîné une importation nucléaire de HELZ2 dans l'étude de Surapureddi et ses collègues (Surapureddi et al. 2002). En effet il existe un lien entre l'IFN α et PPAR α puisque WY-1464, un agoniste de PPAR α renforce l'effet antiviral de l'IFN- α contre le HCV (Read et al. 2015).

HELZ2 semble donc être localisée majoritairement dans le cytoplasme. Ceci suggère des substrats cytoplasmiques à ses différents domaines. Cependant, l'observation de l'augmentation de la fraction nucléaire après traitement à l'IFN- α (Fusco et al. 2017), peut amener à supposer que HELZ2 joue possiblement un second rôle dans le noyau lors d'une attaque virale par exemple.

4.1.2 Les domaines hélicases de HELZ2 hydrolysent l'ATP en ADP.

A l'aide des protéines GFP-HELZ2 produites dans les cellules humaines, j'ai pu démontrer que les domaines hélicases de type Upf1-like présents au sein de HELZ2 sont capables d'hydrolyser l'ATP *in vitro*. L'un des désavantages de cette technique de purification des protéines recombinantes est que la purification n'est pas aussi pure qu'elle pourrait être après une purification sur plusieurs phases de chromatographie. Ceci a été confirmé par la présence d'une activité ATPase abondante dans les essais d'activité ATPase et plus probablement des protéines chaperonnes lors des premiers tests d'activité réalisés. De plus, les western blots réalisés pour chaque expérience ne donnent pas une valeur absolue de la quantité de protéine présente sur les billes. Si la quantité absolue de protéine utilisée dans l'essai est trop faible par rapport à la quantité d'ATP utilisé, cela explique l'observation d'une activité ATPase qui paraît faible.

De plus, il serait nécessaire de tester la capacité de HELZ2 à ouvrir des duplexes d'acides nucléiques ainsi qu'identifier son ou ses substrats qui sont vraisemblablement des ARN, dû à sa localisation cytoplasmique ainsi qu'à la présence de doigts de zinc connus pour lier l'ARN et du domaine RNB, lui aussi ciblant l'ARN. Cependant, il est possible que les domaines hélicases de HELZ2 soient actifs lorsque la protéine est importée dans le noyau, dans ce cas on peut imaginer des duplexes ADN-ADN ou ADN-ARN.

D'autres paramètres pourraient être étudiés en utilisant les protéines GFP-HELZ2 :

- Sa polarité, à savoir le sens dans lequel elle va se déplacer sur l'ARN ou l'ADN ;
- La présence d'une potentielle séquence ou structure cible ;
- Le fait qu'elle nécessite un simple brin ou un double brin d'acide nucléique pour se fixer ;
- Le fait que dans ses substrats ARN il pourrait y avoir des structures secondaires stables qui bloqueraient la dégradation.

L'utilisation de duplexes d'acides nucléiques marqués afin de tester la capacité des domaines hélicases à les ouvrir semble être la prochaine expérience à réaliser dans la caractérisation de ces domaines.

Il serait aussi intéressant de produire puis de purifier une protéine tronquée où l'activité ATPase est toujours présente pour étudier l'activité des domaines hélicases avec une méthode récente appelée « magnetic tweezers ». C'est une technique de manipulation à l'échelle d'une seule molécule qui permet la mesure en temps réel des activités enzymatiques sur des molécules individuelles d'acide nucléique à haute résolution, à haut débit et à force constante (Seol, Strub, et Neuman 2016; Salas, Gocheva, et Nöllmann 2015).

[4.1.3 Le domaine RNB de HELZ2 est fonctionnel et ses caractéristiques sont proches des domaines RNB déjà caractérisés](#)

J'ai ensuite utilisé les protéines GFP-HELZ2 et des acides nucléiques marqués en 5' avec de la fluorescéine pour tester l'activité nucléase *in vitro* du domaine RNB de HELZ2. Ainsi j'ai pu démontrer que HELZ2 dégrade l'ARN en libérant un produit final de 5 nucléotides de long. Cela m'a permis d'en déduire que la dégradation est réalisée dans le sens 3'-5', ce qui correspond à l'activité connue du domaine RNB (Dziembowski et al. 2007). Ci-dessous la numérotation correspondant à la RNaseII d'*E. coli* sera utilisée dans un souci de compréhension.

Les autres membres de la famille des RNaseII/RNB comme la RNase II et Dis3 relarguent des fragments finaux faisant entre 2 et 5 nucléotides de long (Barbas et al. 2008; Matos, Barbas, et Arraiano 2009; Rafal Tomecki et al. 2010).

On note que des mutations du domaine RNB sont capables d'augmenter la taille du produit de la dégradation, par exemple, une mutation de la Tyr-253, au sein de la protéine RNase II augmente la longueur du produit final de 4 à 10 nucléotides en fonction de la mutation (Barbas et al. 2008). On remarque que cette tyrosine est conservée chez HELZ2 (Tyr-1397) (flèche verte Figure 29). Plus récemment une étude structurale de l'exosome de levure a démontré que les résidus aspartate 207 et arginine 258 du RNB de Dis3 interagissent avec l'extrémité 3' de l'ARN (Makino, Baumgärtner, et Conti 2013). Ces acides aminés sont respectivement une asparagine (Asn-1352) et une glutamine (Gln-1402) chez HELZ2 (flèches rouge et noire Figure 29), ce qui pourrait expliquer une taille légèrement plus longue du produit final.

On remarque aussi dans ces essais d'activité nucléase que très peu de produits intermédiaires sont visibles entre le 20 mer d'ARN et le produit final. Ceci laisse imaginer que la processivité de HELZ2 est grande. Cependant il faudrait utiliser un oligonucléotide plus long et faire une cinétique avec des temps plus court pour confirmer cette observation. De plus, l'absence d'intermédiaire n'exclut pas une activité exonucléase 5'-3' qui couperait plusieurs nucléotides à la fois. Afin de confirmer qu'un nucléotide 5' monophosphate est relargué à chaque étape, comme démontré pour les autres membres de la famille RNaseII/RNB (Gupta, Kasai, et Schlessinger 1977; Cannistraro et Kennell 1994; Dziembowski et al. 2007), il faudrait réaliser un essai nucléase avec un ARN marqué en 3'. L'utilisation de la fluorescéine pouvant empêcher l'accès de la protéine, un marquage radioactif pourrait être utilisé.

Avec des expériences similaires j'ai démontré que l'activité RNase de HELZ2 nécessite des ions divalents magnésium ou manganèse. Ces même résultats ont été reportés pour la protéine DIS3L2 (Lubas et al. 2013). Il a aussi été montré que l'activité de Dis3 est inhibée à haute concentration de Mg^{2+} (Dziembowski et al. 2007), ce qui n'est pas le cas pour HELZ2. Il est possible que ceci soit dû à la présence de l'asparagine à la place de l'acide aspartique très conservé en position 207. En présence des autres cations divalents testés une activité résiduelle ou totalement absente a été observée, ce qui est en corrélation avec les résultats d'études menées sur les autres membres de la famille montrant que le site actif fixe soit un Mg^{2+} , soit un Mn^{2+} (Dziembowski et al. 2007; Reis et al. 2013).

J'ai observé que le domaine RNB ne suffit pas pour dégrader l'ARN *in vitro*. J'ai pu démontrer qu'en plus du domaine RNB, le second domaine hélicase, ainsi que le linker

entre ces domaines sont nécessaires à l'activité RNase. Ce résultat laisse à penser que ce linker est nécessaire au bon repliement des domaines hélicases et RNB ou à l'interaction avec un partenaire non-identifié. Bien qu'aucun motif ou séquences connues n'ont pu être identifiés dans ce linker, il peut aussi être important pour la localisation de la protéine ou une potentielle modification. Le domaine hélicase joue peut-être le rôle de domaine de liaison à l'ARN et remplace ainsi les domaines CSD et S1 présents dans les autres protéines de la famille RNase II/RNB et qui sont absents chez HELZ2, notamment dans l'isoforme court qui ne comporte pas les doigts de zinc. En perspective, il serait intéressant d'étudier si une protéine composée du premier domaine hélicase, du linker le liant au RNB et du RNB est aussi capable de dégrader l'ARN *in vitro*.

Une expérience préliminaire présentée en 3.2.4.4 semble indiquer que HELZ2 ne possède pas de spécificité de séquence, comme pour la majorité des membres de la famille RNase II/RNB. Cependant, de légères différences d'efficacités de dégradation en fonction du substrat ont été reportées. Par exemple, alors que la RNase II de *E. coli* et la RNase R sont plus actifs sur l'homopolymère de poly (A), la protéine de levure Rrp44 / Dis3 semble être plus active sur les séquences riches en AU et sur des substrats hétérogènes (Reis et al. 2013). Comme décrit précédemment, la protéine DIS3L2 a une affinité beaucoup plus importante pour les extensions polyU (Lubas et al. 2013, 2; Malecki et al. 2013).

Il est aussi remarquable que les 3 résidus aspartates et le résidu asparagine présents aux positions « catalytiques » de la protéine HELZ2 humaine soient très conservés chez les mammifères, mais ne soient pas conservés chez les invertébrés (voir annexe 1). Le résidu asparagine est absent et un seul des 3 résidus aspartate est présent chez le pétoncle. Chez l'huître, aucun de ces acides-aminés n'est présent. Ces observations suggèrent que la protéine HELZ2 des mollusques n'a pas d'activité nucléase. La conservation de ce domaine pourrait alors être liée à son importance dans le repliement de la protéine. On peut également suggérer que même avec ces substitutions, cette protéine conserve une activité comme la possibilité de se lier à aux acides nucléiques ou une activité hélicase.

[4.1.4 HELZ2 fixe l'ADN mais le dégrade pas](#)

J'ai aussi obtenu des résultats indiquant que HELZ2 est capable de fixer l'ADN et que les domaines responsables sont soit le RNB soit le second domaine hélicase puisque

la construction 2 (Figure 36) possède cette activité. Il est possible que l'ADN soit fixé par le RNB comme c'est le cas pour la RNase II qui peut lier l'ADN, bien qu'elle ne soit pas capable de le dégrader. En outre, il a été montré que la RNase II est inhibée par un oligonucléotide d'ADN (Cannistraro et Kennell 1994). De plus avec les essais de dégradation d'acides nucléiques *in vitro* j'ai pu démontrer que HELZ2 n'était pas capable de dégrader l'ADN, ce qui est concordant avec les caractéristiques de la RNase II. Il est aussi possible que les domaines hélicases de HELZ2 soient capables d'utiliser l'ADN comme substrat étant donné que la sous-famille Upf1-like comporte des hélicases à ARN et à ADN (voir introduction). Une expérience supplémentaire où ces deux domaines sont testés de manière indépendante est donc nécessaire pour déterminer si le domaine RNB et/ou les domaines hélicases sont responsables de la fixation de l'ADN *in vitro*.

4.2 Quel(s) rôle(s) la protéine HELZ2 joue-t-elle dans les cellules ?

En parallèle de la caractérisation biochimique de HELZ2 j'ai étudié son rôle *in cellulo*. J'ai tenté de réaliser une lignée cellulaire Knock Out pour HELZ2 par la méthode CRISPR/Cas9 afin de pouvoir identifier les ARN cibles du domaine RNB. Mes tentatives avec cette méthode sont restées infructueuses. Ceci peut être dû à un nombre trop petit de clones cellulaires testés. Du fait que les clones HELZ2^{-/-} prolifèrent plus lentement que les sauvages, cela entraîne la sélection des clones sauvages qui ont plus proliférés que les mutants. Il est aussi possible que la protéine soit essentielle dans les cellules HEK293. Cependant cette dernière hypothèse est discutable puisque des souris HELZ2^{-/-} ont été créées et sont viables.

Afin de pallier le manque de cellules humaines HELZ2^{-/-} il serait possible d'utiliser des ARNi comme décrit par Fusco et ses collègues (Fusco et al. 2017) pour diminuer l'expression de HELZ2 et ainsi identifier les ARN cibles du RNB par analyse transcriptomique globale. Cela est l'une des perspectives principales de l'étude de la protéine HELZ2.

Afin d'identifier les ARN cibles de la protéine HELZ2 dans son intégralité, la méthode de iCLIP (individual-nucleotide resolution Cross-Linking and ImmunoPrecipitation) pourrait être utilisée. Cette méthode utilise une lumière UV afin de lier de manière covalente les protéines avec les molécules d'ARN. Après immunoprécipitation des protéines avec les billes GFP-Trap® ou un anticorps dirigé contre la protéine endogène, les ARN co-précipités sont purifiés, fragmentés et séquencés (Konig et al. 2011). Des

méthodes similaires ont démontré que DIS3 cible de nombreux ARN aberrants ou des produits de transcription pervasive et que DIS3L2 cible les ARN uridylés (Szczepińska et al. 2015; Ustianenko et al. 2016). L'identification des cibles permettrait de savoir si HELZ2 fixe tous les ARN, uniquement un type d'ARN comme les ARNm, les ARNt, les ARNr, d'autres ARNnc ou des ARN exogènes. Une autre possibilité est que HELZ2 ne cible que les ARN portant un motif précis pouvant être une séquence nucléotidique, une modification chimique ou une structure secondaire.

L'identification des ARN associés à HELZ2 permettrait ensuite d'étudier si leur stabilité, leur localisation ou leur structure secondaire est changée.

[4.2.1 Niveau d'expression de HELZ2 dans différentes lignées cancéreuses](#)

J'ai pu montrer qu'il existe une différence d'expression de HELZ2 α dans certaines lignées cancéreuses par rapport à leurs homologues saines. Par exemple, une sous-expression de HELZ2 α dans les cellules de cancer du sein MCF7 a été observée par rapport aux cellules MCF10A. Cependant, pour approfondir un potentiel rôle de HELZ2 dans certains cancers du sein, il serait intéressant d'étudier les niveaux d'expression de HELZ2 dans des cellules saines et cancéreuses pour chaque patiente. L'étude des niveaux d'expression de HELZ2 dans plusieurs biopsies de cancer du sein du même type pourrait aussi montrer si une sous-expression de HELZ2 est une constante dans ce type de cancer de sein. Si une telle corrélation est observée, HELZ2 pourrait devenir une cible thérapeutique.

[4.2.2 Quels sont les partenaires protéiques de HELZ2 ?](#)

La surexpression des protéines de fusions GFP-HELZ2 dans les cellules HEK293 ne m'a pas permis d'identifier de partenaires protéiques. En utilisant cette méthode, aucun nouveau partenaire ni aucun des partenaires décrits dans la littérature n'a été identifié. Dans la littérature, des interactions avec PPAR α et γ qui ont été identifiées par tests d'associations *in vitro* (Surapureddi et al. 2002; Tomaru et al. 2006). THRAP3 a été identifié par spectrométrie de masse d'extraits nucléaires après surexpression de flag-HELZ2 β dans les cellules HEK293 (Katano-Toki et al. 2013). Plus récemment, une immunoprécipitation avec des anticorps anti-HELZ2 a permis d'identifier AHR comme partenaire dans les cellules HeLa (Fusco et al. 2017).

Les raisons pouvant expliquer le fait qu'aucun de ces partenaires n'ait été retrouvé avec l'utilisation des protéines étiquetées GFP dans les cellules HEK293 sont multiples :

- le type cellulaire utilisé n'est peut-être pas approprié,
- le fait que j'ai utilisé une surexpression protéique, malgré que cette surexpression semble limitée comme observé sur la Figure 41.
- le potentiel encombrement stérique généré par l'étiquette GFP, ce qui constitue un autre inconvénient de l'utilisation d'une purification avec les billes GFP-Trap[®],
- le fait que les interactions soient instables,
- le fait que très peu de HELZ2 soit situé dans le noyau alors que tous les partenaires décrits sont des protéines nucléaires.

La méthode alternative permettant d'étudier les interactions protéiques de la protéine endogène consiste à réaliser une immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre HELZ2 puis d'analyser les protéines co-immunoprécipitées par spectrométrie de masse. Ceci peut être réalisé soit sur un lysat de protéines totales soit sur un extrait nucléaires afin de retrouver les partenaires nucléaires décrits dans la littérature.

4.2.3 Rôles de HELZ2 décrits dans la littérature

Jusqu'à présent HELZ2 a été décrit comme un cofacteur de plusieurs récepteurs nucléaires et tous ces différents rôles de cette protéine ont été supposés être en lien avec cette activité. D'autres hypothèses peuvent être formulées en prenant en compte les différentes activités enzymatiques de cette protéine que cette thèse a mis en évidence.

Les souris KO pour HELZ2 sont protégées contre l'obésité induite par un régime riche en graisse, les auteurs ont supposé que ceci est dû à la sous-expression du récepteur à la leptine dans le foie (Yoshino et al. 2014). J'ai démontré que HELZ2 est capable de dégrader des ARN, on peut supposer que l'ARNm du récepteur à la leptine dans le foie des souris est l'une des cibles du RNB de HELZ2.

Le rôle de HELZ2 dans la suppression des virus de la dengue et de l'hépatite C reste aussi à déterminer (Fusco et al. 2013; 2017). Il serait très intéressant d'étudier les niveaux d'ARN viraux lorsque que HELZ2 est inhibé. Ensuite, l'identification des cibles

ARN de HELZ2 en utilisant la méthode iCLIP décrite plus haut dans des cellules infectées par ces virus pourrait être une perspective. Ces deux virus sont des virus à ARN appartenant à la famille des *Flaviviridae* qui possèdent un génome à ARN linéaire non segmenté simple brin à polarité positive (Simmonds et al. 2017). Il est donc possible que HELZ2 cible directement l'ARN génomique de ces virus, comme le font la RNase L ainsi que certains membres de la famille des RNase A. Certaines hélicases à ARN comme celles de la famille des récepteurs de type RIG-I sont aussi connues pour faire partie des composants de la réponse antivirale innée qui atténue la réplication virale (Ranji et Boris-Lawrie 2010). MOV10, une hélicase de la même famille que HELZ2 possède aussi un effet antiviral (Balinsky et al. 2017). En effet, ces hélicases reconnaissent directement l'ARN viral, entraînant une cascade de signalisation aboutissant à la sécrétion d'IFN α/β . Cela induit la transcription des ISG responsables de la lutte antivirale innée. Cependant il a été montré que HELZ2 ne possède pas d'effet antiviral lorsqu'il est surexprimé seul (Fusco et al. 2017), un partenaire serait alors nécessaire si cette hypothèse se révélait correcte. Une autre hypothèse est que HELZ2 dégrade des ARN cellulaires permettant de faire passer la cellule d'un état « pro-viral » à un état « anti-viral » notamment en modifiant la composition en acides gras de la cellule (Fusco et al. 2017). En effet il a été montré que la composition de certains acides gras est modifiée lors de l'inhibition de l'expression de HELZ2, essentiellement une diminution du triglycéride TAG 54:6.

En conclusion, cette étude a mis en lumière la présence de doigts de zinc, de domaines hélicases capables d'hydrolyser l'ATP en ADP ainsi qu'un domaine RNB dégradant l'ARN *in vitro* et possédant des caractéristiques proches des domaines RNB déjà connus. Avant cette étude, HELZ2 était uniquement considérée comme un co-activateur de la transcription mais la présence et l'activité de ses domaines lie aussi la protéine HELZ2 au métabolisme des ARN. On peut imaginer que ces fonctions fonctionnent indépendamment l'une de l'autre, mais il est possible d'imaginer une synergie entre ces deux fonctions. Par exemple, il peut être nécessaire de dégrader des ARN anti-sens afin d'activer la transcription de gènes cibles. Ceci permet d'envisager différemment les rôles de HELZ2. Que ce soit dans la protection contre les virus de la Dengue et de l'hépatite C (Fusco et al. 2013; 2017), mais aussi dans le métabolisme des acides gras (Katano-Toki et al. 2013; Yoshino et al. 2014; Fusco et al. 2017). De plus, sa location majoritairement cytoplasmique laisse à penser que

HELZ2 cible des ARN cytoplasmiques. Un autre rôle peut être supposé lors de l'importation dans le noyau après induction par l'IFN α . D'autres études sont aussi nécessaires afin d'étudier un potentiel rôle de HELZ2 dans le cancer et plus particulièrement dans le cancer du sein.

5. Références

5 Références

- Abdel-Monem, M., H. Dürwald, et H. Hoffmann-Berling. 1976. « Enzymic Unwinding of DNA. 2. Chain Separation by an ATP-Dependent DNA Unwinding Enzyme ». *European Journal of Biochemistry* 65 (2): 441-49. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10359.x>.
- Abshire, Elizabeth T., Jennifer Chasseur, Jennifer A. Bohn, Paul A. Del Rizzo, Peter L. Freddolino, Aaron C. Goldstrohm, et Raymond C. Trievel. 2018. « The Structure of Human Nocturnin Reveals a Conserved Ribonuclease Domain That Represses Target Transcript Translation and Abundance in Cells ». *Nucleic Acids Research* 46 (12): 6257-70. <https://doi.org/10.1093/nar/gky412>.
- Amblar, Mónica, et Cecília M. Arraiano. 2005. « A Single Mutation in Escherichia Coli Ribonuclease II Inactivates the Enzyme without Affecting RNA Binding ». *The FEBS Journal* 272 (2): 363-74. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04477.x>.
- Arraiano, Cecília Maria, Fabienne Mauxion, Sandra Cristina Viegas, Rute Gonçalves Matos, et Bertrand Séraphin. 2013. « Intracellular ribonucleases involved in transcript processing and decay: Precision tools for RNA ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, RNA Decay Mechanisms*, 1829 (6): 491-513. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.03.009>.
- Astuti, Dewi, Mark R. Morris, Wendy N. Cooper, Raymond H. J. Staals, Naomi C. Wake, Graham A. Fewes, Harmeet Gill, et al. 2012. « Germline Mutations in DIS3L2 Cause the Perlman Syndrome of Overgrowth and Wilms Tumor Susceptibility ». *Nature Genetics* 44 (3): 277-84. <https://doi.org/10.1038/ng.1071>.
- Baleriola, Jimena, et Ulrich Hengst. 2015. « Targeting Axonal Protein Synthesis in Neuroregeneration and Degeneration ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 12 (1): 57-65. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0308-8>.
- Balinsky, Corey A., Hana Schmeisser, Alexandra I. Wells, Sundar Ganesan, Tengchuan Jin, Kavita Singh, et Kathryn C. Zoon. 2017. « IRAV (FLJ11286), an Interferon-Stimulated Gene with Antiviral Activity against Dengue Virus,

- Interacts with MOV10 ». *Journal of Virology* 91 (5).
<https://doi.org/10.1128/JVI.01606-16>.
- Ballut, Lionel, Brice Marchadier, Aurélie Baguet, Catherine Tomasetto, Bertrand Séraphin, et Hervé Le Hir. 2005. « The Exon Junction Core Complex Is Locked onto RNA by Inhibition of EIF4AIII ATPase Activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (10): 861-69. <https://doi.org/10.1038/nsmb990>.
- Banerjee, Shuvojit, Geqiang Li, Yize Li, Christina Gaughan, Danika Baskar, Yvonne Parker, Daniel J. Lindner, Susan R. Weiss, et Robert H. Silverman. 2015. « RNase L Is a Negative Regulator of Cell Migration ». *Oncotarget* 6 (42): 44360-72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6246>.
- Banfalvi, Gaspar. 2011. « Overview of Cell Synchronization ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 761: 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6_1.
- Barbas, Ana, Rute G. Matos, Mónica Amblar, Eduardo López-Viñas, Paulino Gomez-Puertas, et Cecília M. Arraiano. 2008. « New Insights into the Mechanism of RNA Degradation by Ribonuclease II: Identification of the Residue Responsible for Setting the RNase II End Product ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13070-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709989200>.
- Barthelme, Dominik, Stephanie Dinkelaker, Sonja-Verena Albers, Paola Londei, Ulrich Ermler, et Robert Tampé. 2011. « Ribosome Recycling Depends on a Mechanistic Link between the FeS Cluster Domain and a Conformational Switch of the Twin-ATPase ABCE1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (8): 3228-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015953108>.
- Becker, Thomas, Jean-Paul Armache, Alexander Jarasch, Andreas M. Anger, Elizabeth Villa, Heidemarie Sieber, Basma Abdel Motaal, Thorsten Mielke, Otto Berninghausen, et Roland Beckmann. 2011. « Structure of the No-Go mRNA Decay Complex Dom34-Hbs1 Bound to a Stalled 80S Ribosome ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (6): 715-20. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2057>.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, et E. Izaurralde. 2006. « MicroRNAs Silence Gene Expression by Repressing Protein Expression and/or by Promoting mRNA

- Decay ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71 (janvier): 523-30. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.013>.
- Behm-Ansmant, Isabelle, David Gatfield, Jan Rehwinkel, Valérie Hilgers, et Elisa Izaurralde. 2007. « A Conserved Role for Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein 1 (PABPC1) in Nonsense-Mediated mRNA Decay ». *The EMBO Journal* 26 (6): 1591-1601. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601588>.
- Behm-Ansmant, Isabelle, Jan Rehwinkel, Tobias Doerks, Alexander Stark, Peer Bork, et Elisa Izaurralde. 2006. « mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes ». *Genes & Development* 20 (14): 1885-98. <https://doi.org/10.1101/gad.1424106>.
- Belair, Cedric, Soyeong Sim, Kun-Yong Kim, Yoshiaki Tanaka, In-Hyun Park, and, et Sandra L. Wolin. 2019. « The RNA Exosome Nuclease Complex Regulates Human Embryonic Stem Cell Differentiation ». *The Journal of Cell Biology* 218 (8): 2564-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811148>.
- Berndt, Heike, Christiane Harnisch, Christiane Rammelt, Nadine Stöhr, Anne Zirkel, Juliane C. Dohm, Heinz Himmelbauer, Joao-Paulo Tavanez, Stefan Hüttelmaier, et Elmar Wahle. 2012. « Maturation of Mammalian H/ACA Box SnoRNAs: PAPD5-Dependent Adenylation and PARN-Dependent Trimming ». *RNA (New York, N.Y.)* 18 (5): 958-72. <https://doi.org/10.1261/rna.032292.112>.
- Bhattacharya, A, K Czaplinski, P Trifillis, F He, A Jacobson, et S W Peltz. 2000. « Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. » *RNA* 6 (9): 1226-35.
- Birse, Charles E., Lionel Minvielle-Sebastia, Barbara A. Lee, Walter Keller, et Nick J. Proudfoot. 1998. « Coupling Termination of Transcription to Messenger RNA Maturation in Yeast ». *Science* 280 (5361): 298-301. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.298>.
- Bisbal, Catherine, et Tamim Salehzada. 2008. « La RNase L, un acteur essentiel de la réponse cellulaire antivirale ». *médecine/sciences* 24 (10): 859-64. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082410859>.

- Brandman, Onn, et Ramanujan S Hegde. 2016. « Ribosome-associated protein quality control ». *Nature structural & molecular biology* 23 (1): 7-15. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3147>.
- Braunschweig, Ulrich, Nuno L. Barbosa-Morais, Qun Pan, Emil N. Nachman, Babak Alipanahi, Thomas Gonatopoulos-Pournatzis, Brendan Frey, Manuel Irimia, et Benjamin J. Blencowe. 2014. « Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes ». *Genome Research* 24 (11): 1774-86. <https://doi.org/10.1101/gr.177790.114>.
- Brooks, Seth A., et Perry J. Blackshear. 2013. « Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action ». *Biochimica et biophysica acta* 1829 (0): 666-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.003>.
- Buxbaum, Adina R., Gal Haimovich, et Robert H. Singer. 2015. « In the Right Place at the Right Time: Visualizing and Understanding MRNA Localization ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (2): 95-109. <https://doi.org/10.1038/nrm3918>.
- Cahová, Hana, Marie-Luise Winz, Katharina Höfer, Gabriele Nübel, et Andres Jäschke. 2015. « NAD CaptureSeq Indicates NAD as a Bacterial Cap for a Subset of Regulatory RNAs ». *Nature* 519 (7543): 374-77. <https://doi.org/10.1038/nature14020>.
- Cannistraro, Vincent J., et David Kennell. 1994. « The Processive Reaction Mechanism of Ribonuclease II ». *Journal of Molecular Biology* 243 (5): 930-43. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1693>.
- Cevher, Murat A., Xiaokan Zhang, Sully Fernandez, Sergey Kim, Jorge Baquero, Per Nilsson, Sean Lee, Anders Virtanen, et Frida E. Kleiman. 2010. « Nuclear Deadenylation/Polyadenylation Factors Regulate 3' Processing in Response to DNA Damage ». *The EMBO Journal* 29 (10): 1674-87. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.59>.
- Chamieh, Hala, Lionel Ballut, Fabien Bonneau, et Hervé Le Hir. 2008. « NMD Factors UPF2 and UPF3 Bridge UPF1 to the Exon Junction Complex and Stimulate Its

- RNA Helicase Activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (1): 85-93. <https://doi.org/10.1038/nsmb1330>.
- Chang, Chung-Te, Natalia Bercovich, Belinda Loh, Stefanie Jonas, et Elisa Izaurralde. 2014. « The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1 ». *Nucleic Acids Research* 42 (8): 5217-33. <https://doi.org/10.1093/nar/gku129>.
- Chang, Chung-Te, Sowndarya Muthukumar, Ramona Weber, Yevgen Levdansky, Ying Chen, Dipankar Bhandari, Catia Igreja, Lara Wohlbold, Eugene Valkov, et Elisa Izaurralde. 2019. « A low-complexity region in human XRN1 directly recruits deadenylation and decapping factors in 5'–3' messenger RNA decay ». *Nucleic Acids Research* 47 (17): 9282-95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz633>.
- Chang, Hao-Ming, Robinson Triboulet, James E. Thornton, et Richard I. Gregory. 2013. « A Role for the Perlman Syndrome Exonuclease Dis3l2 in the Lin28-Let-7 Pathway ». *Nature* 497 (7448): 244-48. <https://doi.org/10.1038/nature12119>.
- Charenton, Clément, Claudine Gaudon-Plesse, Zaineb Fourati, Valerio Taverniti, Régis Back, Olga Kolesnikova, Bertrand Séraphin, et Marc Graille. 2017. « A Unique Surface on Pat1 C-Terminal Domain Directly Interacts with Dcp2 Decapping Enzyme and Xrn1 5'–3' MRNA Exonuclease in Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (45): E9493-9501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711680114>.
- Charenton, Clément, Valerio Taverniti, Claudine Gaudon-Plesse, Régis Back, Bertrand Séraphin, et Marc Graille. 2016. « Structure of the Active Form of Dcp1–Dcp2 Decapping Enzyme Bound to m⁷GDP and Its Edc3 Activator ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (11): 982-86. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3300>.
- Chen, Chyi-Ying A., et Ann-Bin Shyu. 2013. « Deadenylation and P-bodies ». *Advances in experimental medicine and biology* 768: 183-95. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5107-5_11.
- Chen, Y. Grace, Walter E. Kowtoniuk, Isha Agarwal, Yinghua Shen, et David R. Liu. 2009. « LC/MS Analysis of Cellular RNA Reveals NAD-Linked RNA ». *Nature Chemical Biology* 5 (12): 879-81. <https://doi.org/10.1038/nchembio.235>.

- Cheng, Zhihong, Denise Muhrad, Meng Kiat Lim, Roy Parker, et Haiwei Song. 2007. « Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core ». *The EMBO Journal* 26 (1): 253-64. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601464>.
- Chin, Ashley, et Eric Lécuyer. 2017. « RNA localization: Making its way to the center stage ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Biochemistry of Synthetic Biology - Recent Developments*, 1861 (11, Part B): 2956-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.011>.
- Chlebowski, Aleksander, Michał Lubas, Torben Heick Jensen, et Andrzej Dziembowski. 2013. « RNA Decay Machines: The Exosome ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1829 (6-7): 552-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.006>.
- Cole, Sarah E., Frederick J. LaRiviere, Christopher N. Merrikh, et Melissa J. Moore. 2009. « A Convergence of RRNA and MRNA Quality Control Pathways Revealed by Mechanistic Analysis of Nonfunctional RRNA Decay ». *Molecular Cell* 34 (4): 440-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.017>.
- Costa, Paulo J. da, Juliane Menezes, Margarida Saramago, Juan F. García-Moreno, Hugo A. Santos, Margarida Gama-Carvalho, Cecília M. Arraiano, Sandra C. Viegas, et Luísa Romão. 2019. « A role for DIS3L2 over natural nonsense-mediated mRNA decay targets in human cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 518 (4): 664-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.105>.
- De, Inessa, Sergey Bessonov, Romina Hofele, Karine dos Santos, Cindy L. Will, Henning Urlaub, Reinhard Lührmann, et Vladimir Pena. 2015. « The RNA Helicase Aquarius Exhibits Structural Adaptations Mediating Its Recruitment to Spliceosomes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (2): 138-44. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2951>.
- Dever, Thomas E., et Rachel Green. 2012. « The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>.
- Dicthenberg, Jason B., Sharon A. Swanger, Laura N. Antar, Robert H. Singer, et Gary J. Bassell. 2008. « A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic MRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X

Syndrome ». *Developmental Cell* 14 (6): 926-39.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.003>.

- Dijk, Erwin van, Nicolas Cougot, Sylke Meyer, Sylvie Babajko, Elmar Wahle, et Bertrand Séraphin. 2002. « Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures ». *The EMBO Journal* 21 (24): 6915-24. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf678>.
- Ding, Li, Timothy J. Ley, David E. Larson, Christopher A. Miller, Daniel C. Koboldt, John S. Welch, Julie K. Ritchey, et al. 2012. « Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing ». *Nature* 481 (7382): 506-10. <https://doi.org/10.1038/nature10738>.
- Doma, Meenakshi K., et Roy Parker. 2006. « Endonucleolytic Cleavage of Eukaryotic MRNAs with Stalls in Translation Elongation ». *Nature* 440 (7083): 561-64. <https://doi.org/10.1038/nature04530>.
- Domachowske, J. B., K. D. Dyer, C. A. Bonville, et H. F. Rosenberg. 1998. « Recombinant Human Eosinophil-Derived Neurotoxin/RNase 2 Functions as an Effective Antiviral Agent against Respiratory Syncytial Virus ». *The Journal of Infectious Diseases* 177 (6): 1458-64. <https://doi.org/10.1086/515322>.
- Dominissini, Dan, Sharon Moshitch-Moshkovitz, Schraga Schwartz, Mali Salmon-Divon, Lior Ungar, Sivan Osenberg, Karen Cesarkas, et al. 2012. « Topology of the Human and Mouse M6A RNA Methylomes Revealed by M6A-Seq ». *Nature* 485 (7397): 201-6. <https://doi.org/10.1038/nature11112>.
- D'Orazio, Karole N., Colin Chih-Chien Wu, Niladri Sinha, Raphael Loll-Krippleber, Grant W. Brown, et Rachel Green. 2019. « The Endonuclease Cue2 Cleaves MRNAs at Stalled Ribosomes during No Go Decay ». *ELife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49117>.
- Dujardin, Gwendal, Élisabeth Daguene, Delphine G. Bernard, Marion Flodrops, Stéphanie Durand, Aurélie Chauveau, Flaria El Khoury, Catherine Le Jossic-Corcoc, et Laurent Corcos. 2016. « L'épissage des ARN pré-messagers : quand le spliceosome perd pied ». *médecine/sciences* 32 (12): 1103-10. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163212014>.

- Dziembowski, Andrzej, Esben Lorentzen, Elena Conti, et Bertrand Séraphin. 2007. « A Single Subunit, Dis3, Is Essentially Responsible for Yeast Exosome Core Activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (1): 15-22. <https://doi.org/10.1038/nsmb1184>.
- Elabd, Christian, Chiara Chiellini, Mamen Carmona, Jean Galitzky, Olivia Cochet, Rasmus Petersen, Luc Pénicaud, et al. 2009. « Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells Differentiate into Functional Brown Adipocytes ». *STEM CELLS* 27 (11): 2753-60. <https://doi.org/10.1002/stem.200>.
- Estrella, Michael A., Jin Du, Li Chen, Sneha Rath, Eliza Prangley, Alisha Chitrakar, Tsutomu Aoki, Paul Schedl, Joshua Rabinowitz, et Alexei Korennykh. 2019. « The metabolites NADP⁺ and NADPH are the targets of the circadian protein Nocturnin (Curled) ». *Nature Communications* 10 (mai). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10125-z>.
- Estrella, Michael A., Jin Du, et Alexei Korennykh. 2018. « Crystal Structure of Human Nocturnin Catalytic Domain ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34615-0>.
- Fairfax, Benjamin P, Seiko Makino, Jayachandran Radhakrishnan, Katharine Plant, Stephen Leslie, Alexander Dilthey, Peter Ellis, Cordelia Langford, Fredrik O Vannberg, et Julian C Knight. 2012. « Genetics of Gene Expression in Primary Immune Cells Identifies Cell Type-Specific Master Regulators and Roles of HLA Alleles ». *Nature Genetics* 44 (5): 502-10. <https://doi.org/10.1038/ng.2205>.
- Fairman-Williams, Margaret E., Ulf-Peter Guenther, et Eckhard Jankowsky. 2010. « SF1 and SF2 helicases: family matters ». *Current opinion in structural biology* 20 (3): 313-24. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>.
- Fallini, Claudia, Paul G. Donlin-Asp, Jeremy P. Rouanet, Gary J. Bassell, et Wilfried Rossoll. 2016. « Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs MRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (13): 3811-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2396-15.2016>.
- Farina, Kim L., Stefan Hüttelmaier, Kiran Musunuru, Robert Darnell, et Robert H. Singer. 2003. « Two ZBP1 KH domains facilitate β -actin mRNA localization,

- granule formation, and cytoskeletal attachment ». *The Journal of Cell Biology* 160 (1): 77-87. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206003>.
- Fiorini, Francesca, Marc Boudvillain, et Hervé Le Hir. 2013. « Tight intramolecular regulation of the human Upf1 helicase by its N- and C-terminal domains ». *Nucleic Acids Research* 41 (4): 2404-15. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1320>.
- Frazão, C., C. E. McVey, M. Amblar, A. Barbas, C. Vonrhein, C. M. Arraiano, et M. A. Carrondo. 2006. « Unravelling the Dynamics of RNA Degradation by Ribonuclease II and Its RNA-Bound Complex. » *Nature* 443 (7107): 110-14. <https://doi.org/10.1038/nature05080>.
- Frost, Robert J. A., F. Kent Hamra, James A. Richardson, Xiaoxia Qi, Rhonda Bassel-Duby, et Eric N. Olson. 2010. « MOV10L1 Is Necessary for Protection of Spermatocytes against Retrotransposons by Piwi-Interacting RNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26): 11847-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007158107>.
- Fu, Mingui, et Perry J. Blackshear. 2017. « RNA-Binding Proteins in Immune Regulation: A Focus on CCCH Zinc Finger Proteins ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (2): 130-43. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.129>.
- Fusco, Dahlene N., Cynthia Brisac, Sinu P. John, Yi-Wen Huang, Christopher R. Chin, Tiao Xie, Hong Zhao, et al. 2013. « A Genetic Screen Identifies Interferon- α Effector Genes Required to Suppress Hepatitis C Virus Replication ». *Gastroenterology* 144 (7): 1438-1449.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.026>.
- Fusco, Dahlene N., Henry Pratt, Stephen Kandilas, Scarlett Se Yun Cheon, Wenyu Lin, D. Alex Cronkite, Megha Basavappa, et al. 2017. « HELZ2 Is an IFN Effector Mediating Suppression of Dengue Virus ». *Frontiers in Microbiology* 8 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00240>.
- Galloway, Alison, et Victoria H. Cowling. 2019. « mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, mRNA modifications in gene expression control, 1862 (3): 270-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.011>.

- Gandhi, Rikesh, Mahira Manzoor, et Katalin A. Hudak. 2008. « Depurination of Brome Mosaic Virus RNA3 in Vivo Results in Translation-Dependent Accelerated Degradation of the Viral RNA ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (47): 32218-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803785200>.
- Glavan, Filip, Isabelle Behm-Ansmant, Elisa Izaurralde, et Elena Conti. 2006. « Structures of the PIN Domains of SMG6 and SMG5 Reveal a Nuclease within the MRNA Surveillance Complex ». *The EMBO Journal* 25 (21): 5117-25. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601377>.
- Gniazdowski, M., J. L. Mandel, F. Gissinger, C. Keding, et P. Chambon. 1970. « Calf thymus RNA polymerases exhibit template specificity ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 38 (6): 1033-40. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90343-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90343-8).
- Godwin, Alan R., Shihoko Kojima, Carla B. Green, et Jeffrey Wilusz. 2013. « Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology ». *Biochimica et biophysica acta* 1829 (0): 571-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.12.004>.
- Gorbalenya, Alexander E., et Eugene V. Koonin. 1993. « Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships ». *Current Opinion in Structural Biology* 3 (3): 419-29. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80116-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80116-2).
- Green, Carla B., Nicholas Douris, Shihoko Kojima, Carl A. Strayer, Joseph Fogerty, David Lourim, Susanna R. Keller, et Joseph C. Besharse. 2007. « Loss of Nocturnin, a Circadian Deadenylase, Confers Resistance to Hepatic Steatosis and Diet-Induced Obesity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (23): 9888-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702448104>.
- Grudzien-Nogalska, Ewa, et Megerditch Kiledjian. 2017. « New Insights into Decapping Enzymes and Selective mRNA Decay ». *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 8 (1). <https://doi.org/10.1002/wrna.1379>.
- Guenther, Ulf-Peter, Lusy Handoko, Bernhard Lagerbauer, Sibylle Jablonka, Ashwin Chari, Mona Alzheimer, Jürgen Ohmer, et al. 2009. « IGHMBP2 Is a Ribosome-Associated Helicase Inactive in the Neuromuscular Disorder Distal SMA Type

- 1 (DSMA1) ». *Human Molecular Genetics* 18 (7): 1288-1300. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp028>.
- Gupta, R. S., T. Kasai, et D. Schlessinger. 1977. « Purification and Some Novel Properties of Escherichia Coli RNase II. » *Journal of Biological Chemistry* 252 (24): 8945-49.
- Haberle, Vanja, et Alexander Stark. 2018. « Eukaryotic Core Promoters and the Functional Basis of Transcription Initiation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (10): 621-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>.
- Han, Zhong, Domenico Libri, et Odil Porrua. 2017. « Biochemical Characterization of the Helicase Sen1 Provides New Insights into the Mechanisms of Non-Coding Transcription Termination ». *Nucleic Acids Research* 45 (3): 1355-70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1230>.
- Hanet, Aoife, Felix Räscher, Ramona Weber, Vincenzo Ruscica, Maria Fauser, Tobias Räscher, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, et al. 2019. « HELZ directly interacts with CCR4–NOT and causes decay of bound mRNAs ». *Life Science Alliance* 2 (5). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900405>.
- Hasgall, Philippe A., David Hoogewijs, Marius B. Faza, Vikram G. Panse, Roland H. Wenger, et Gieri Camenisch. 2011. « The Putative RNA Helicase HELZ Promotes Cell Proliferation, Translation Initiation and Ribosomal Protein S6 Phosphorylation ». *PLoS ONE* 6 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022107>.
- He, Feng, et Allan Jacobson. 2015. « Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story ». *Annual Review of Genetics* 49: 339-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054639>.
- Henras, Anthony K, Célia Plisson-Chastang, Marie-Françoise O'Donohue, Anirban Chakraborty, et Pierre-Emmanuel Gleizes. 2015. « An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 6 (2): 225-42. <https://doi.org/10.1002/wrna.1269>.
- Heo, Inha, Chirlmin Joo, Young-Kook Kim, Minju Ha, Mi-Jeong Yoon, Jun Cho, Kyu-Hyeon Yeom, Jinju Han, et V. Narry Kim. 2009. « TUT4 in Concert with Lin28

- Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation ». *Cell* 138 (4): 696-708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.002>.
- Hir, Hervé Le, Jérôme Saulière, et Zhen Wang. 2016. « The Exon Junction Complex as a Node of Post-Transcriptional Networks ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (1): 41-54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>.
- Ho, C. Kiong, et Stewart Shuman. 1999. « Distinct Roles for CTD Ser-2 and Ser-5 Phosphorylation in the Recruitment and Allosteric Activation of Mammalian mRNA Capping Enzyme ». *Molecular Cell* 3 (3): 405-11. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80468-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80468-2).
- Hogg, J. Robert, et Stephen P. Goff. 2010. « Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay ». *Cell* 143 (3): 379-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.005>.
- Hou, Dezhi, Miriam Ruiz, et Erik D. Andrulis. 2012. « The Ribonuclease Dis3 Is an Essential Regulator of the Developmental Transcriptome ». *BMC Genomics* 13 (août): 359. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-359>.
- Hug, Nele, Dasa Longman, et Javier F. Cáceres. 2016. « Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway ». *Nucleic Acids Research* 44 (4): 1483-95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw010>.
- Huntzinger, Eric, Isao Kashima, Maria Fauser, Jérôme Saulière, et Elisa Izaurralde. 2008. « SMG6 Is the Catalytic Endonuclease That Cleaves MRNAs Containing Nonsense Codons in Metazoan ». *RNA (New York, N.Y.)* 14 (12): 2609-17. <https://doi.org/10.1261/rna.1386208>.
- Ivanov, Alexandr, Tatyana Mikhailova, Boris Eliseev, Lahari Yeramala, Elizaveta Sokolova, Denis Susorov, Alexey Shuvalov, Christiane Schaffitzel, et Elena Alkalaeva. 2016. « PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination ». *Nucleic Acids Research* 44 (16): 7766-76. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw635>.
- Jackson, Richard J., Christopher U. T. Hellen, et Tatyana V. Pestova. 2010. « The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (2): 113-27. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.

- Jarvis, Donald L. 2009. « Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems ». In *Methods in Enzymology*, édité par Richard R. Burgess et Murray P. Deutscher, 463:191-222. Guide to Protein Purification, 2nd Edition. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63014-7).
- Jiao, Xinfu, Selom K. Doamekpor, Jeremy G. Bird, Bryce E. Nickels, Liang Tong, Ronald P. Hart, et Megerditch Kiledjian. 2017. « 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding ». *Cell* 168 (6): 1015-1027.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.019>.
- Jones, Christopher Iain, Maria Vasilyevna Zabolotskaya, et Sarah Faith Newbury. 2012. « The 5' → 3' Exoribonuclease XRN1/Pacman and Its Functions in Cellular Processes and Development ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 3 (4): 455-68. <https://doi.org/10.1002/wrna.1109>.
- Jonkers, Iris, et John T. Lis. 2015. « Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 16 (3): 167-77. <https://doi.org/10.1038/nrm3953>.
- Jurica, Melissa S., Lawrence J. Licklider, Steven R. Gygi, Nikolaus Grigorieff, et Melissa J. Moore. 2002. « Purification and Characterization of Native Spliceosomes Suitable for Three-Dimensional Structural Analysis ». *RNA (New York, N.Y.)* 8 (4): 426-39. <https://doi.org/10.1017/s1355838202021088>.
- Kadlec, Jan, Delphine Guilligay, Raimond B. Ravelli, et Stephen Cusack. 2006. « Crystal Structure of the UPF2-Interacting Domain of Nonsense-Mediated MRNA Decay Factor UPF1 ». *RNA (New York, N.Y.)* 12 (10): 1817-24. <https://doi.org/10.1261/rna.177606>.
- Kalisiak, Katarzyna, Tomasz M. Kuliński, Rafał Tomecki, Dominik Cysewski, Zbigniew Pietras, Aleksander Chlebowski, Katarzyna Kowalska, et Andrzej Dziembowski. 2017. « A short splicing isoform of HBS1L links the cytoplasmic exosome and SKI complexes in humans ». *Nucleic Acids Research* 45 (4): 2068-80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw862>.
- Kang, Young-Hoon, Chul-Hwan Lee, et Yeon-Soo Seo. 2010. « Dna2 on the Road to Okazaki Fragment Processing and Genome Stability in Eukaryotes ». *Critical*

- Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45 (2): 71-96.
<https://doi.org/10.3109/10409230903578593>.
- Kashima, Isao, Akio Yamashita, Natsuko Izumi, Naoyuki Kataoka, Ryo Morishita, Shinichi Hoshino, Mutsuhito Ohno, Gideon Dreyfuss, et Shigeo Ohno. 2006. « Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay ». *Genes & Development* 20 (3): 355-67.
<https://doi.org/10.1101/gad.1389006>.
- Katano-Toki, Akiko, Tetsurou Satoh, Takuya Tomaru, Satoshi Yoshino, Takahiro Ishizuka, Sumiyasu Ishii, Atsushi Ozawa, et al. 2013. « THRAP3 Interacts with HELZ2 and Plays a Novel Role in Adipocyte Differentiation ». *Molecular Endocrinology* 27 (5): 769-80. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1332>.
- Kedinger, C., M. Gniazdowski, J. L. Mandel, F. Gissinger, et P. Chambon. 1970. « Alpha-Amanitin: A Specific Inhibitor of One of Two DNA-Dependent RNA Polymerase Activities from Calf Thymus ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 38 (1): 165-71. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(70\)91099-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(70)91099-5).
- Keller, Rebecca W., Uwe Kühn, Mateo Aragón, Larissa Bornikova, Elmar Wahle, et David G. Bear. 2000. « The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail ». Edited by I. Tinoco ». *Journal of Molecular Biology* 297 (3): 569-83.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3572>.
- Khatter, Heena, Alexander G. Myasnikov, S. Kundhavai Natchiar, et Bruno P. Klaholz. 2015. « Structure of the Human 80S Ribosome ». *Nature* 520 (7549): 640-45.
<https://doi.org/10.1038/nature14427>.
- Kilchert, Cornelia, Sina Wittmann, et Lidia Vasiljeva. 2016. « The Regulation and Functions of the Nuclear RNA Exosome Complex ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (4): 227-39. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.15>.
- Kim, Minkyu, Nevan J. Krogan, Lidia Vasiljeva, Oliver J. Rando, Eduard Nedeia, Jack F. Greenblatt, et Stephen Buratowski. 2004. « The Yeast Rat1 Exonuclease

- Promotes Transcription Termination by RNA Polymerase II ». *Nature* 432 (7016): 517-22. <https://doi.org/10.1038/nature03041>.
- Kim, Yoon Ki, et Lynne E. Maquat. 2019. « UPF1 and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond ». *RNA* 25 (4): 407-22. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>.
- Koczera, Patrick, Lukas Martin, Gernot Marx, et Tobias Schuerholz. 2016. « The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081278>.
- Kojima, Shihoko, Kerry L. Gendreau, Elaine L. Sher-Chen, Peng Gao, et Carla B. Green. 2015. « Changes in Poly(A) Tail Length Dynamics from the Loss of the Circadian Deadenylase Nocturnin ». *Scientific Reports* 5 (novembre): 17059. <https://doi.org/10.1038/srep17059>.
- Konig, Julian, Kathi Zarnack, Gregor Rot, Tomaz Curk, Melis Kayikci, Blaz Zupan, Daniel J. Turner, Nicholas M. Luscombe, et Jernej Ule. 2011. « ICLIP-- Transcriptome-Wide Mapping of Protein-RNA Interactions with Individual Nucleotide Resolution ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 50 (avril). <https://doi.org/10.3791/2638>.
- Kowalinski, Eva, Alexander Kögel, Judith Ebert, Peter Reichelt, Elisabeth Stegmann, Bianca Habermann, et Elena Conti. 2016. « Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex ». *Molecular Cell* 63 (1): 125-34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.028>.
- Kung, Che-Pei, Leonard B. Jr Maggi, et Jason D. Weber. 2018. « The Role of RNA Editing in Cancer Development and Metabolic Disorders ». *Frontiers in Endocrinology* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00762>.
- Kwak, Hojoong, et John T. Lis. 2013. « Control of Transcriptional Elongation ». *Annual review of genetics* 47: 483-508. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155440>.
- Łabno, Anna, Rafał Tomecki, et Andrzej Dziembowski. 2016. « Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms ». *Biochimica et Biophysica Acta*

- (*BBA*) - *Molecular Cell Research* 1863 (12): 3125-47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>.
- Łabno, Anna, Zbigniew Warkocki, Tomasz Kuliński, Paweł Szczepan Krawczyk, Krystian Bijata, Rafał Tomecki, et Andrzej Dziembowski. 2016. « Perlman Syndrome Nuclease DIS3L2 Controls Cytoplasmic Non-Coding RNAs and Provides Surveillance Pathway for Maturing SnRNAs ». *Nucleic Acids Research* 44 (21): 10437-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw649>.
- Lai, Tingfeng, Hana Cho, Zhou Liu, Matthew W. Bowler, Shunfu Piao, Roy Parker, Yoon Ki Kim, et Haiwei Song. 2012. « Structural Basis of the PNR2-Mediated Link between mRNA Surveillance and Decapping ». *Structure* 20 (12): 2025-37. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.09.009>.
- Lai, Wi S., Danielle M. Carrick, et Perry J. Blackshear. 2005. « Influence of Nonameric AU-Rich Tristetraprolin-Binding Sites on mRNA Deadenylation and Turnover ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 34365-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506757200>.
- Lau, Nga-Chi, Annemieke Kolkman, Frederik M. A. van Schaik, Klaas W. Mulder, W. W. M. Pim Pijnappel, Albert J. R. Heck, et H. Th Marc Timmers. 2009. « Human Ccr4-Not Complexes Contain Variable Deadenylation Subunits ». *The Biochemical Journal* 422 (3): 443-53. <https://doi.org/10.1042/BJ20090500>.
- Le Hir, H., D. Gatfield, E. Izaurralde, et M. J. Moore. 2001. « The Exon-Exon Junction Complex Provides a Binding Platform for Factors Involved in mRNA Export and Nonsense-Mediated mRNA Decay ». *The EMBO Journal* 20 (17): 4987-97. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>.
- Le Hir, Hervé, Elisa Izaurralde, Lynne E. Maquat, et Melissa J. Moore. 2000. « The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions ». *The EMBO Journal* 19 (24): 6860-69. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6860>.
- Lebreton, Alice, Rafal Tomecki, Andrzej Dziembowski, et Bertrand Séraphin. 2008. « Endonucleolytic RNA Cleavage by a Eukaryotic Exosome ». *Nature* 456 (7224): 993-96. <https://doi.org/10.1038/nature07480>.

- Lee, Kuo-Ming, Ia-Wen Hsu, et Woan-Yuh Tarn. 2010. « TRAP150 activates pre-mRNA splicing and promotes nuclear mRNA degradation ». *Nucleic Acids Research* 38 (10): 3340-50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq017>.
- Lee, Nathan N., Venkata R. Chalamcharla, Francisca Reyes-Turcu, Sameet Mehta, Martin Zofall, Vanivilasini Balachandran, Jothy Dhakshnamoorthy, et al. 2013. « Mtr4-like protein coordinates nuclear RNA processing for heterochromatin assembly and for telomere maintenance ». *Cell* 155 (5): 1061-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.027>.
- Lejeune, Fabrice, Xiaojie Li, et Lynne E. Maquat. 2003. « Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylating, and Exonucleolytic Activities ». *Molecular Cell* 12 (3): 675-87. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00349-6).
- Li, Bing, Michael Carey, et Jerry L. Workman. 2007. « The Role of Chromatin during Transcription ». *Cell* 128 (4): 707-19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>.
- Li, Ping, Guanting Lu, Li Wang, Ying Cui, Ziyang Wu, Si Chen, Jing Li, et al. 2016. « A Rare Nonsynonymous Variant in the Lipid Metabolic Gene HELZ2 Related to Primary Biliary Cirrhosis in Chinese Han ». *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 12 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0120-6>.
- Li, Ran, Jiping Yue, Yu Zhang, Lan Zhou, Wei Hao, Jiangang Yuan, Boqin Qiang, Jian M. Ding, Xiaozhong Peng, et Ji-Min Cao. 2008. « CLOCK/BMAL1 Regulates Human Nocturnin Transcription through Binding to the E-Box of Nocturnin Promoter ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 317 (1): 169-77. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9846-x>.
- Lim, Jaechul, Minju Ha, Hyesik Chang, S. Chul Kwon, Dharendra K. Simanshu, Dinshaw J. Patel, et V. Narry Kim. 2014. « Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation ». *Cell* 159 (6): 1365-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.055>.
- Lionetti, Marta, Marzia Barbieri, Katia Todoerti, Luca Agnelli, Sonia Fabris, Giovanni Tonon, Simona Segalla, et al. 2015. « A compendium of DIS3 mutations and associated transcriptional signatures in plasma cell dyscrasias ». *Oncotarget* 6 (28): 26129-41.

- Liu, Chao, Xue Zhang, Feng Huang, Bin Yang, Jun Li, Bingfeng Liu, Haihua Luo, Ping Zhang, et Hui Zhang. 2012. « APOBEC3G Inhibits MicroRNA-Mediated Repression of Translation by Interfering with the Interaction between Argonaute-2 and MOV10 ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (35): 29373-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354001>.
- Liu, Quansheng, Jaclyn C. Greimann, et Christopher D. Lima. 2006. « Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome ». *Cell* 127 (6): 1223-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.037>.
- Liu, Yusheng, Xukun Lu, Junchao Shi, Xingjiang Yu, Xiaoxin Zhang, Kai Zhu, Zhaohong Yi, Enkui Duan, et Lei Li. 2016. « BTG4 Is a Key Regulator for Maternal mRNA Clearance during Mouse Early Embryogenesis ». *Journal of Molecular Cell Biology* 8 (4): 366-68. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw023>.
- Loh, Belinda, Stefanie Jonas, et Elisa Izaurralde. 2013. « The SMG5-SMG7 Heterodimer Directly Recruits the CCR4-NOT Deadenylation Complex to MRNAs Containing Nonsense Codons via Interaction with POP2 ». *Genes & Development* 27 (19): 2125-38. <https://doi.org/10.1101/gad.226951.113>.
- Lorentzen, Esben, Jerome Basquin, Rafal Tomecki, Andrzej Dziembowski, et Elena Conti. 2008. « Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rps44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family ». *Molecular Cell* 29 (6): 717-28. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.018>.
- Lu, Lu, Javier Arranz-Trullén, Guillem Prats-Ejarque, David Pulido, Sanjib Bhakta, et Ester Boix. 2019. « Human Antimicrobial RNases Inhibit Intracellular Bacterial Growth and Induce Autophagy in Mycobacteria-Infected Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10: 1500. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01500>.
- Lu, Lu, Jiarui Li, Mohammed Moussaoui, et Ester Boix. 2018. « Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01012>.
- Luan, Siyu, Junyun Luo, Hui Liu, et Zhaoyong Li. 2019. « Regulation of RNA decay and cellular function by 3'-5' exoribonuclease DIS3L2 ». *RNA Biology* 16 (2): 160-65. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1564466>.

- Lubas, Michal, Christian K. Damgaard, Rafal Tomecki, Dominik Cysewski, Torben Heick Jensen, et Andrzej Dziembowski. 2013. « Exonuclease HDIS3L2 Specifies an Exosome-Independent 3'-5' Degradation Pathway of Human Cytoplasmic mRNA ». *The EMBO Journal* 32 (13): 1855-68. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.135>.
- Lykke-Andersen, Jens, et Eric J. Bennett. 2014. « Protecting the Proteome: Eukaryotic Cotranslational Quality Control Pathways ». *The Journal of Cell Biology* 204 (4): 467-76. <https://doi.org/10.1083/jcb.201311103>.
- Lyons, Shawn M., Marta M. Fay, Yasutoshi Akiyama, Paul J. Anderson, et Pavel Ivanov. 2016. « RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives ». *RNA Biology* 14 (2): 171-78. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272746>.
- Lyons, Shawn M., Marta M. Fay, et Pavel Ivanov. 2018. « The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage ». *FEBS Letters* 592 (17): 2828-44. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13205>.
- Makino, Debora Lika, Marc Baumgärtner, et Elena Conti. 2013. « Crystal Structure of an RNA-Bound 11-Subunit Eukaryotic Exosome Complex ». *Nature* 495 (7439): 70-75. <https://doi.org/10.1038/nature11870>.
- Malecki, Michal, Sandra C. Viegas, Tiago Carneiro, Pawel Golik, Clémentine Dressaire, Miguel G. Ferreira, et Cecília M. Arraiano. 2013. « The Exoribonuclease Dis3L2 Defines a Novel Eukaryotic RNA Degradation Pathway ». *The EMBO Journal* 32 (13): 1842-54. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.63>.
- Martin, Georges, Sylvie Doublé, et Walter Keller. 2008. « Determinants of substrate specificity in RNA-dependent nucleotidyl transferases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Novel RNA nucleotidyl transferases and gene regulation, 1779 (4): 206-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.12.003>.
- Martínez-Montiel, Nancy, Laura Morales-Lara, Julio M. Hernández-Pérez, et Rebeca D. Martínez-Contreras. 2016. « In Silico Analysis of the Structural and Biochemical Features of the NMD Factor UPF1 in *Ustilago Maydis* ». *PLOS ONE* 11 (2): e0148191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148191>.

- Marzluff, William F., et Kaitlin P. Koreski. 2017. « Birth and Death of Histone MRNAs ». *Trends in Genetics* 33 (10): 745-59. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.014>.
- Matera, A. Gregory, et Zefeng Wang. 2014. « A day in the life of the spliceosome ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (2): 108-21. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>.
- Matos, Rute Gonçalves, Ana Barbas, et Cecília Maria Arraiano. 2009. « RNase R Mutants Elucidate the Catalysis of Structured RNA: RNA-Binding Domains Select the RNAs Targeted for Degradation ». *The Biochemical Journal* 423 (2): 291-301. <https://doi.org/10.1042/BJ20090839>.
- Mauxion, Fabienne, Chyi-Ying A. Chen, Bertrand Séraphin, et Ann-Bin Shyu. 2009. « BTG/TOB factors impact deadenylases ». *Trends in biochemical sciences* 34 (12): 640-47. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.07.008>.
- Mauxion, Fabienne, Brigitte Prève, et Bertrand Séraphin. 2013. « C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 Form a New Module of the CCR4-NOT Complex ». *RNA Biology* 10 (2): 267-76. <https://doi.org/10.4161/rna.23065>.
- Meister, Gunter, Markus Landthaler, Lasse Peters, Po Yu Chen, Henning Urlaub, Reinhard Lührmann, et Thomas Tuschl. 2005. « Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins ». *Current Biology: CB* 15 (23): 2149-55. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.048>.
- Menezes, Miriam R., Julien Balzeau, et John P. Hagan. 2018. « 3' RNA Uridylation in Epitranscriptomics, Gene Regulation, and Disease ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00061>.
- Milac, Adina L., Elzbieta Bojarska, et Anna Wypijewska del Nogal. 2014. « Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839 (6): 452-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.04.007>.
- Mittal, Saloni, Akhmed Aslam, Rachel Doidge, Rachel Medica, et G. Sebastiaan Winkler. 2011. « The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) Deadenylase Subunits of the Human Ccr4-Not Complex Contribute to the Prevention of Cell

- Death and Senescence ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (6): 748-58. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-11-0898>.
- Molleston, Jerome M., Leah R. Sabin, Ryan H. Moy, Sanjay V. Menghani, Keiko Rausch, Beth Gordesky-Gold, Kaycie C. Hopkins, et al. 2016. « A conserved virus-induced cytoplasmic TRAMP-like complex recruits the exosome to target viral RNA for degradation ». *Genes & Development* 30 (14): 1658-70. <https://doi.org/10.1101/gad.284604.116>.
- Mugridge, Jeffrey S., Ryan W. Tibble, Marcin Ziemniak, Jacek Jemielity, et John D. Gross. 2018. « Structure of the Activated Edc1-Dcp1-Dcp2-Edc3 MRNA Decapping Complex with Substrate Analog Poised for Catalysis ». *Nature Communications* 9 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03536-x>.
- Mullen, Thomas E., et William F. Marzluff. 2008. « Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5' ». *Genes & Development* 22 (1): 50-65. <https://doi.org/10.1101/gad.1622708>.
- Nagarajan, Vinay K., Christopher I. Jones, Sarah F. Newbury, et Pamela J. Green. 2013. « XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions ». *Biochimica et biophysica acta* 1829 (0): 590-603. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.03.005>.
- Nogimori, Takuto, Kyutatsu Nishiura, Sho Kawashima, Takahiro Nagai, Yuka Oishi, Nao Hosoda, Hiroaki Imataka, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, et Shin-ichi Hoshino. 2019. « Dom34 mediates targeting of exogenous RNA in the antiviral OAS/RNase L pathway ». *Nucleic Acids Research* 47 (1): 432-49. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1087>.
- Ogami, Koichi, Yaqiong Chen, et James L. Manley. 2018. « RNA Surveillance by the Nuclear RNA Exosome: Mechanisms and Significance ». *Non-Coding RNA* 4 (1). <https://doi.org/10.3390/ncrna4010008>.
- Okada-Katsuhata, Yukiko, Akio Yamashita, Kei Kutsuzawa, Natsuko Izumi, Fumiki Hirahara, et Shigeo Ohno. 2012. « N- and C-Terminal Upf1 Phosphorylations Create Binding Platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD ». *Nucleic Acids Research* 40 (3): 1251-66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr791>.

- Okamura, Masumi, Haruko Inose, et Seiji Masuda. 2015. « RNA Export through the NPC in Eukaryotes ». *Genes* 6 (1): 124-49. <https://doi.org/10.3390/genes6010124>.
- Okumura, Shiro, Hiroyuki Saitoh, Naoya Wasano, Hideki Katayama, Kazuhiko Higuchi, Eiichi Mizuki, et Kuniyo Inouye. 2006. « Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* ». *Protein Expression and Purification* 47 (1): 144-51. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.011>.
- O'Neil, J. D., A. J. Ammit, et A. R. Clark. 2018. « MAPK P38 Regulates Inflammatory Gene Expression via Tristetraprolin: Doing Good by Stealth ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 94 (janvier): 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.003>.
- Padhi, Aditya K., Priyam Narain, Upma Dave, Rohit Satija, Anirudh Patir, et James Gomes. 2019. « Insights into the Role of Ribonuclease 4 Polymorphisms in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 37 (1): 116-30. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1419147>.
- Park, Ok Hyun, Joori Park, Mira Yu, Hyoung-Tae An, Jesang Ko, et Yoon Ki Kim. 2016. « Identification and molecular characterization of cellular factors required for glucocorticoid receptor-mediated mRNA decay ». *Genes & Development* 30 (18): 2093-2105. <https://doi.org/10.1101/gad.286484.116>.
- Parsons, D. Williams, Meng Li, Xiaosong Zhang, Siân Jones, Rebecca J. Leary, Jimmy Cheng-Ho Lin, Simina M. Boca, et al. 2011. « The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6016): 435-39. <https://doi.org/10.1126/science.1198056>.
- Pawłowska, Elzbieta, Joanna Szczepanska, et Janusz Blasiak. 2017. « DNA2—An Important Player in DNA Damage Response or Just Another DNA Maintenance Protein? ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071562>.
- Pirouz, Mehdi, Peng Du, Marzia Munafò, et Richard I. Gregory. 2016. « Dis3l2-Mediated Decay Is a Quality Control Pathway for Noncoding RNAs ». *Cell reports* 16 (7): 1861-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.025>.

- Pisani, Didier F., Mansour Djedaini, Guillaume E. Beranger, Christian Elabd, Marcel Scheideler, Gérard Ailhaud, et Ez-Zoubir Amri. 2011. « Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into “Brite” (Brown-in-White) Adipocytes ». *Frontiers in Endocrinology* 2 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00087>.
- Pisareva, Vera P., Maxim A. Skabkin, Christopher U. T. Hellen, Tatyana V. Pestova, et Andrey V. Pisarev. 2011. « Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of Mammalian Vacant 80S Ribosomes and Stalled Elongation Complexes ». *The EMBO Journal* 30 (9): 1804-17. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.93>.
- Porrua, Odil, et Domenico Libri. 2015. « Transcription Termination and the Control of the Transcriptome: Why, Where and How to Stop ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (3): 190-202. <https://doi.org/10.1038/nrm3943>.
- Powell, Lyn M., Simon C. Wallis, Richard J. Pease, Yvonne H. Edwards, Timothy J. Knott, et James Scott. 1987. « A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine ». *Cell* 50 (6): 831-40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90510-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90510-1).
- Pujantell, Maria, Eva Riveira-Muñoz, Roger Badia, Marc Castellví, Edurne Garcia-Vidal, Guillem Sirera, Teresa Puig, et al. 2017. « RNA Editing by ADAR1 Regulates Innate and Antiviral Immune Functions in Primary Macrophages ». *Scientific Reports* 7 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13580-0>.
- Rabani, Michal, Raktima Raychowdhury, Marko Jovanovic, Michael Rooney, Deborah J. Stumpo, Nir Hacohen, Alexander F. Schier, et al. 2014. « High resolution sequencing and modeling identifies distinct dynamic RNA regulatory strategies ». *Cell* 159 (7): 1698-1710. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.015>.
- Raisch, Tobias, Chung-Te Chang, Yevgen Levdansky, Sowndarya Muthukumar, Stefan Raunser, et Eugene Valkov. 2019. « Reconstitution of Recombinant Human CCR4-NOT Reveals Molecular Insights into Regulated Deadenylation ». *Nature Communications* 10 (1): 3173. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11094-z>.
- Ranji, Arnaz, et Kathleen Boris-Lawrie. 2010. « RNA helicases ». *RNA Biology* 7 (6): 775-87. <https://doi.org/10.4161/rna.7.6.14249>.

- Read, Scott A., Enoch S. Tay, Mahsa Shahidi, John McLauchlan, Jacob George, et Mark W. Douglas. 2015. « The Mechanism of Interferon Refractoriness During Hepatitis C Virus Infection and Its Reversal with a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonist ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35 (6): 488-97. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0209>.
- Reis, Filipa P., Vânia Pobre, Inês J. Silva, Michal Malecki, et Cecília M. Arraiano. 2013. « The RNase II/RNB Family of Exoribonucleases: Putting the 'Dis' in Disease ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (5): 607-15. <https://doi.org/10.1002/wrna.1180>.
- Robinson, Sophie R., Antony W. Oliver, Timothy J. Chevassut, et Sarah F. Newbury. 2015. « The 3' to 5' Exoribonuclease DIS3: From Structure and Mechanisms to Biological Functions and Role in Human Disease ». *Biomolecules* 5 (3): 1515-39. <https://doi.org/10.3390/biom5031515>.
- Rocak, Sanda, et Patrick Linder. 2004. « DEAD-Box Proteins: The Driving Forces behind RNA Metabolism ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (3): 232-41. <https://doi.org/10.1038/nrm1335>.
- Rodriguez, Anne-Marie, Christian Elabd, Frédéric Delteil, Julien Astier, Cécile Vernochet, Perla Saint-Marc, Joëlle Guesnet, et al. 2004. « Adipocyte Differentiation of Multipotent Cells Established from Human Adipose Tissue ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315 (2): 255-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.053>.
- Rotger, Margalida, Judith Dalmau, Andri Rauch, Paul McLaren, Steven E. Bosinger, Raquel Martinez, Netanya G. Sandler, et al. 2011. « Comparative Transcriptomics of Extreme Phenotypes of Human HIV-1 Infection and SIV Infection in Sooty Mangabey and Rhesus Macaque ». *Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2391-2400. <https://doi.org/10.1172/JCI45235>.
- Roux, Christian, Didier F. Pisani, Hédi Ben Yahia, Mansour Djedaini, Guillaume E. Beranger, Jean-Claude Chambard, Damien Ambrosetti, et al. 2013. « Chondrogenic Potential of Stem Cells Derived from Adipose Tissue: A Powerful Pharmacological Tool ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440 (4): 786-91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.012>.

- Ruan, Lin, Masanori Osawa, Nao Hosoda, Shunsuke Imai, Asako Machiyama, Toshiaki Katada, Shin-ichi Hoshino, et Ichio Shimada. 2010. « Quantitative Characterization of Tob Interactions Provides the Thermodynamic Basis for Translation Termination-Coupled Deadenylase Regulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (36): 27624-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138867>.
- Rugeles, Maria T., Charles M. Trubey, Victoria I. Bedoya, Ligia A. Pinto, Joost J. Oppenheim, Susanna M. Rybak, et Gene M. Shearer. 2003. « Ribonuclease Is Partly Responsible for the HIV-1 Inhibitory Effect Activated by HLA Alloantigen Recognition ». *AIDS (London, England)* 17 (4): 481-86. <https://doi.org/10.1097/00002030-200303070-00002>.
- Sainsbury, Sarah, Carrie Bernecky, et Patrick Cramer. 2015. « Structural Basis of Transcription Initiation by RNA Polymerase II ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (3): 129-43. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>.
- Saito, Syuhei, Nao Hosoda, et Shin-ichi Hoshino. 2013. « The Hbs1-Dom34 Protein Complex Functions in Non-Stop mRNA Decay in Mammalian Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17832-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448977>.
- Salas, Desiree, Veronika Gocheva, et Marcelo Nöllmann. 2015. « Constructing a Magnetic Tweezers to Monitor RNA Translocation at the Single-Molecule Level ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1259: 257-73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2214-7_16.
- Saramago, Margarida, Paulo J. da Costa, Sandra C. Viegas, et Cecília M. Arraiano. 2019. « The Implication of mRNA Degradation Disorders on Human Disease: Focus on DIS3 and DIS3-Like Enzymes ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1157: 85-98. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1_4.
- Schäfer, Ingmar B., Masami Yamashita, Jan Michael Schuller, Steffen Schüssler, Peter Reichelt, Mike Strauss, et Elena Conti. 2019. « Molecular Basis for Poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase ». *Cell* 177 (6): 1619-1631.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.013>.
- Schuch, Benjamin, Monika Feigenbutz, Debora L. Makino, Sebastian Falk, Claire Basquin, Phil Mitchell, et Elena Conti. 2014. « The Exosome-Binding Factors

- Rrp6 and Rrp47 Form a Composite Surface for Recruiting the Mtr4 Helicase ». *The EMBO Journal* 33 (23): 2829-46. <https://doi.org/10.15252/embj.201488757>.
- Schuller, Anthony P., et Rachel Green. 2018. « Roadblocks and Resolutions in Eukaryotic Translation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (8): 526-41. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0011-4>.
- Seol, Yeonee, Marie-Paule Strub, et Keir C. Neuman. 2016. « Single molecule measurements of DNA helicase activity with magnetic tweezers and t-test based step-finding analysis ». *Methods (San Diego, Calif.)* 105 (août): 119-27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.030>.
- Sharma, P. M., M. Bowman, S. L. Madden, F. J. Rauscher, et S. Sukumar. 1994. « RNA Editing in the Wilms' Tumor Susceptibility Gene, WT1. » *Genes & Development* 8 (6): 720-31. <https://doi.org/10.1101/gad.8.6.720>.
- Shi, Hailing, Jiangbo Wei, et Chuan He. 2019. « Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers ». *Molecular Cell* 74 (4): 640-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.025>.
- Shoemaker, Christopher J., et Rachel Green. 2012. « Translation drives mRNA quality control ». *Nature structural & molecular biology* 19 (6): 594-601. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2301>.
- Simmonds, Peter, Paul Becher, Jens Bukh, Ernest A Gould, Gregor Meyers, Tom Monath, Scott Muerhoff, et al. 2017. « ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae ». *The Journal of General Virology* 98 (1): 2-3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>.
- Singleton, Martin R., Mark S. Dillingham, et Dale B. Wigley. 2007. « Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases ». *Annual Review of Biochemistry* 76: 23-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300>.
- Spahr, P. F. 1964. « PURIFICATION AND PROPERTIES OF RIBONUCLEASE II FROM ESCHERICHIA COLI ». *The Journal of Biological Chemistry* 239 (novembre): 3716-26.

- Staals, Raymond H J, Alfred W Bronkhorst, Geurt Schilders, Shimyn Slomovic, Gadi Schuster, Albert J R Heck, Reinout Raijmakers, et Ger J M Pruijn. 2010. « Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome ». *The EMBO Journal* 29 (14): 2358-67. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.122>.
- Stupfler, Benjamin, Catherine Birck, Bertrand Séraphin, et Fabienne Mauxion. 2016. « BTG2 Bridges PABPC1 RNA-Binding Domains and CAF1 Deadenylation to Control Cell Proliferation ». *Nature Communications* 7 (février): 10811. <https://doi.org/10.1038/ncomms10811>.
- Surapureddi, S., S. Yu, H. Bu, T. Hashimoto, A. V. Yeldandi, P. Kashireddy, M. Cherkaoui-Malki, et al. 2002. « Identification of a Transcriptionally Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Interacting Cofactor Complex in Rat Liver and Characterization of PRIC285 as a Coactivator ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18): 11836-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.182426699>.
- Szczepińska, Teresa, Katarzyna Kalisiak, Rafal Tomecki, Anna Labno, Lukasz S. Borowski, Tomasz M. Kulinski, Dorota Adamska, Joanna Kosinska, et Andrzej Dziembowski. 2015. « DIS3 Shapes the RNA Polymerase II Transcriptome in Humans by Degrading a Variety of Unwanted Transcripts ». *Genome Research* 25 (11): 1622-33. <https://doi.org/10.1101/gr.189597.115>.
- Tange, Thomas Ø, Toshiharu Shibuya, Melissa S. Jurica, et Melissa J. Moore. 2005. « Biochemical Analysis of the EJC Reveals Two New Factors and a Stable Tetrameric Protein Core ». *RNA (New York, N.Y.)* 11 (12): 1869-83. <https://doi.org/10.1261/rna.2155905>.
- Taverniti, Valerio, et Bertrand Séraphin. 2015. « Elimination of Cap Structures Generated by MRNA Decay Involves the New Scavenger MRNA Decapping Enzyme Aph1/FHIT Together with DcpS ». *Nucleic Acids Research* 43 (1): 482-92. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1251>.
- Thomas, Marshall P., Xing Liu, Jennifer Whangbo, Geoffrey McCrossan, Keri B. Sanborn, Emre Basar, Michael Walch, et Judy Lieberman. 2015. « Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global MRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2 ». *Cell Reports* 11 (7): 1079-89. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.026>.

- Tian, Bin, et James L. Manley. 2017. « Alternative Polyadenylation of mRNA Precursors ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (1): 18-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.116>.
- Tomaru, Takuya, Teturo Satoh, Satoshi Yoshino, Takahiro Ishizuka, Koshi Hashimoto, Tsuyoshi Monden, Masanobu Yamada, et Masatomo Mori. 2006. « Isolation and Characterization of a Transcriptional Cofactor and Its Novel Isoform That Bind the Deoxyribonucleic Acid-Binding Domain of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ». *Endocrinology* 147 (1): 377-88. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0450>.
- Tomecki, R., K. Drazkowska, I. Kucinski, K. Stodus, R. J. Szczesny, J. Gruchota, E. P. Owczarek, K. Kalisiak, et A. Dziembowski. 2014. « Multiple Myeloma-Associated HDIS3 Mutations Cause Perturbations in Cellular RNA Metabolism and Suggest HDIS3 PIN Domain as a Potential Drug Target ». *Nucleic Acids Research* 42 (2): 1270-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt930>.
- Tomecki, Rafal, Maiken S. Kristiansen, Søren Lykke-Andersen, Aleksander Chlebowski, Katja M. Larsen, Roman J. Szczesny, Karolina Drazkowska, et al. 2010. « The Human Core Exosome Interacts with Differentially Localized Processive RNases: HDIS3 and HDIS3L ». *The EMBO Journal* 29 (14): 2342-57. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.121>.
- Towler, Benjamin P., Christopher I. Jones, Kirsty L. Harper, Joseph A. Waldron, et Sarah F. Newbury. 2016. « A Novel Role for the 3'-5' Exoribonuclease Dis3L2 in Controlling Cell Proliferation and Tissue Growth ». *RNA Biology* 13 (12): 1286-99. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1232238>.
- Trippe, Ralf, Elena Guschina, Markus Hossbach, Henning Urlaub, Reinhard Lührmann, et Bernd-Joachim Benecke. 2006. « Identification, Cloning, and Functional Analysis of the Human U6 SnRNA-Specific Terminal Uridylyl Transferase ». *RNA (New York, N.Y.)* 12 (8): 1494-1504. <https://doi.org/10.1261/rna.87706>.
- Trixl, Lukas, et Alexandra Lusser. 2019. « The Dynamic RNA Modification 5-Methylcytosine and Its Emerging Role as an Epitranscriptomic Mark ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 10 (1): e1510. <https://doi.org/10.1002/wrna.1510>.

- Trotman, Jackson B., et Daniel R. Schoenberg. 2019. « A recap of RNA recapping ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 10 (1): e1504. <https://doi.org/10.1002/wrna.1504>.
- Ustianenko, Dmytro, Josef Pasulka, Zuzana Feketova, Lukas Bednarik, Dagmar Zigackova, Andrea Fortova, Mihaela Zavolan, et Stepanka Vanacova. 2016. « TUT-DIS3L2 is a mammalian surveillance pathway for aberrant structured non-coding RNAs ». *The EMBO Journal* 35 (20): 2179-91. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694857>.
- Venge, P., J. Byström, M. Carlson, L. Håkansson, M. Karawaczyk, C. Peterson, L. Sevéus, et A. Trulsson. 1999. « Eosinophil Cationic Protein (ECP): Molecular and Biological Properties and the Use of ECP as a Marker of Eosinophil Activation in Disease ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29 (9): 1172-86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00542.x>.
- Vourekas, Anastassios, Ke Zheng, Qi Fu, Manolis Maragkakis, Panagiotis Alexiou, Jing Ma, Ramesh S. Pillai, Zissimos Mourelatos, et P. Jeremy Wang. 2015. « The RNA Helicase MOV10L1 Binds PiRNA Precursors to Initiate PiRNA Processing ». *Genes & Development* 29 (6): 617-29. <https://doi.org/10.1101/gad.254631.114>.
- Wagner, Eileen, Sandra L. Clement, et Jens Lykke-Andersen. 2007. « An Unconventional Human Ccr4-Caf1 Deadenylation Complex in Nuclear Cajal Bodies ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (5): 1686-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.01483-06>.
- Wahle, Elmar, et G. Sebastiaan Winkler. 2013. « RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, RNA Decay Mechanisms*, 1829 (6): 561-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.003>.
- Wang, Bin. 2017. « Human Skin RNases Offer Dual Protection against Invading Bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00624>.
- Wang, Chaozhan, Jiahua Liu, Lili Wang, et Xindu Geng. 2008. « Solubilization and Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Stem Cell

- Factor ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 144 (2): 181-89. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8112-0>.
- Wang, S., Z. Han, D. Libri, O. Porrua, et T. R. Strick. 2019. « Single-Molecule Characterization of Extrinsic Transcription Termination by Sen1 Helicase ». *Nature Communications* 10 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09560-9>.
- Wasmuth, Elizabeth V., et Christopher D. Lima. 2017. « The Rrp6 C-Terminal Domain Binds RNA and Activates the Nuclear RNA Exosome ». *Nucleic Acids Research* 45 (2): 846-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1152>.
- Wei, Chang-Wei, Ting Luo, Shan-Shan Zou, et An-Shi Wu. 2018. « The Role of Long Noncoding RNAs in Central Nervous System and Neurodegenerative Diseases ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00175>.
- Weinmann, Roberto, et Robert G. Roeder. 1974. « Role of DNA-Dependent RNA Polymerase III in the Transcription of the tRNA and 5S RNA Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (5): 1790-94.
- Weiss, Samuel B., et Leonard Gladstone. 1959. « A MAMMALIAN SYSTEM FOR THE INCORPORATION OF CYTIDINE TRIPHOSPHATE INTO RIBONUCLEIC ACID ¹ ». *Journal of the American Chemical Society* 81 (15): 4118-19. <https://doi.org/10.1021/ja01524a087>.
- Weibach, Susann, Christian Langer, Bernhard Puppe, Theodora Nedeva, Elisa Bach, Miriam Kull, Ralf Bargou, et al. 2015. « The Molecular Spectrum and Clinical Impact of DIS3 Mutations in Multiple Myeloma ». *British Journal of Haematology* 169 (1): 57-70. <https://doi.org/10.1111/bjh.13256>.
- Werner, Maria, Elbieta Purta, Katarzyna H. Kaminska, Iwona A. Cymerman, David A. Campbell, Bidyottam Mitra, Jesse R. Zamudio, Nancy R. Sturm, Jacek Jaworski, et Janusz M. Bujnicki. 2011. « 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family ». *Nucleic Acids Research* 39 (11): 4756-68. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr038>.

- West, Steven, Natalia Gromak, et Nick J. Proudfoot. 2004. « Human 5' → 3' Exonuclease Xrn2 Promotes Transcription Termination at Co-Transcriptional Cleavage Sites ». *Nature* 432 (7016): 522-25. <https://doi.org/10.1038/nature03035>.
- Xie, Xin, Pu-Ste Liu, et Piergiorgio Percipalle. 2019. « Analysis of Global Transcriptome Change in Mouse Embryonic Fibroblasts After DsDNA and DsRNA Viral Mimic Stimulation ». *Frontiers in Immunology* 10 (avril): 836. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00836>.
- Yang, De, Qian Chen, Helene F. Rosenberg, Susanna M. Rybak, Dianne L. Newton, Zhao Yuan Wang, Qin Fu, et al. 2004. « Human Ribonuclease A Superfamily Members, Eosinophil-Derived Neurotoxin and Pancreatic Ribonuclease, Induce Dendritic Cell Maturation and Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (10): 6134-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6134>.
- Yang, M., W. S. May, et T. Ito. 1999. « JAZ Requires the Double-Stranded RNA-Binding Zinc Finger Motifs for Nuclear Localization. » *The Journal of Biological Chemistry* 274 (39): 27399-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27399>.
- Yap, Karen, Zhao Qin Lim, Piyush Khandelia, Brad Friedman, et Eugene V. Makeyev. 2012. « Coordinated Regulation of Neuronal mRNA Steady-State Levels through Developmentally Controlled Intron Retention ». *Genes & Development* 26 (11): 1209-23. <https://doi.org/10.1101/gad.188037.112>.
- Yoshino, Satoshi, Tetsuro Satoh, Masanobu Yamada, Koshi Hashimoto, Takuya Tomaru, Akiko Katano-Toki, Satoru Kakizaki, et al. 2014. « Protection Against High-Fat Diet-Induced Obesity in *Helz2* -Deficient Male Mice Due to Enhanced Expression of Hepatic Leptin Receptor ». *Endocrinology* 155 (9): 3459-72. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2160>.
- Zaragosi, Laure-Emmanuelle, Nathalie Billon, Gérard Ailhaud, et Christian Dani. 2007. « Nucleofection Is a Valuable Transfection Method for Transient and Stable Transgene Expression in Adipose Tissue-Derived Stem Cells ». *STEM CELLS* 25 (3): 790-97. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0235>.
- Zhang, Caiyan, Jinrong Fu, et Yufeng Zhou. 2019. « A Review in Research Progress Concerning M6A Methylation and Immunoregulation ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00922>.

- Zhao, Boxuan Simen, Ian A. Roundtree, et Chuan He. 2017. « Post-Transcriptional Gene Regulation by mRNA Modifications ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (1): 31-42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>.
- Zheng, Ke, Jordi Xiol, Michael Reuter, Sigrid Eckardt, N. Adrian Leu, K. John McLaughlin, Alexander Stark, Ravi Sachidanandam, Ramesh S. Pillai, et Peijing Jeremy Wang. 2010. « Mouse MOV10L1 Associates with Piwi Proteins and Is an Essential Component of the Piwi-Interacting RNA (PiRNA) Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26): 11841-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003953107>.
- Zinder, John C., et Christopher D. Lima. 2017. « Targeting RNA for Processing or Destruction by the Eukaryotic RNA Exosome and Its Cofactors ». *Genes & Development* 31 (2): 88-100. <https://doi.org/10.1101/gad.294769.116>.
- Zuo, Yuhong, Helen A. Vincent, Jianwei Zhang, Yong Wang, Murray P. Deutscher, et Arun Malhotra. 2006. « Structural Basis for Processivity and Single-Strand Specificity of RNase II ». *Molecular Cell* 24 (1): 149-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.004>.

6 . Annexes

Annexe 1 : Alignement des séquences protéiques de la protéine HELZ2 de diverses espèces.

Hélicase 1

NP_00102412.2 Homo sapiens	LRRRD--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAL	APRFFDARVLTVMTRASQVAVGDAVALSPGAKLMSRIRFCVRRHSVCFGLSREVVQVVA	QRRNP	FRQDAGAGN
NP_238985.2 Souris	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
NP_00122205.1 Rat	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
NP_00897012.1 Rat	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_009042754.1 Castor	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_005410014.1 Chinchilla	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_00836568.1 Ours blanc	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_00836348.1 Chien	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_023106731.1 Chat	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_023148269.1 Chat	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_010590440.2 Eléphant	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_023375629.1 Roussette	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
PKS25048.1 Bigon	LRRRS--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_005240006.2 Faucon	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_004947338.1 Poule	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_026508605.1 Tortue	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_025057501.1 Alligator	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_007440213.2 Vombat	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_007705742.1 Vombat	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_020837255.1 Koala	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_020825778.1 Ornithorynque	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_021347586.1 Petoncle	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG
XP_022318171.1 Huître	LRKKO--LGVVSGEHLIPGRFRVVLVSTVETVCSLIPGAP	TRFFRFPVLAVMTRASQVAVGDAVALSPGAKRNDMSRIRFCIERSHAPFELSLRIGQVA	QRRNMS	LRKARG



NP_00102412.2 Homo sapiens	MEAPFVQDLARSGAVVTVAVKAPDEALSP--ASNDITLTPQETEAAPAGAEKQEVFPCACAC	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
NP_238985.2 Souris	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
NP_00122205.1 Rat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
NP_00897012.1 Rat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_009042754.1 Castor	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_005410014.1 Chinchilla	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_00836568.1 Ours blanc	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_00836348.1 Chien	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_023106731.1 Chat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_023148269.1 Chat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_010590440.2 Eléphant	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_023375629.1 Roussette	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
PKS25048.1 Bigon	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_005240006.2 Faucon	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_004947338.1 Poule	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_026508605.1 Tortue	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_025057501.1 Alligator	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_007440213.2 Vombat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_007705742.1 Vombat	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_020837255.1 Koala	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_020825778.1 Ornithorynque	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_021347586.1 Petoncle	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY
XP_022318171.1 Huître	SEKSNAGCPFRGASGNTVYVREH--SARAKAKQPAVAHEDTASG	NSASDAAHVA	AAAHG	VS--EADRAAPFPDGE--IADDAILRLLBSKVNY

Annexe 2 : Résultats de spectrométrie de masse

Ech01 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMS	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	80,40	33,39	1	13	13	20	644	66,0	8,12		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	32,37	20,87	1	6	6	8	623	62,0	5,24		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	19,50	13,18	1	5	5	6	584	58,8	5,21		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 épidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	19,47	12,36	1	5	5	6	639	65,4	8,00		
K7ERE3	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=1 - [K7ERE3_HUMAN]	13,21	10,36	2	4	4	4	415	45,2	4,81		
Ech02 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMS	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	85,92	40,53	1	15	17	23	644	66,0	8,12		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	71,64	25,17	1	11	11	21	584	58,8	5,21		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	57,43	29,05	1	9	9	12	623	62,0	5,24		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 épidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	44,94	25,35	1	7	10	12	639	65,4	8,00		
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	15,32	6,44	1	3	4	5	590	62,3	7,74		
H7BXT7	BET1-like protein OS=Homo sapiens GN=BET1L PE=1 SV=1 - [H7BXT7_HUMAN]	3,80	36,21	5	2	2	2	58	6,5	4,88		
ESPV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Homo sapiens GN=NACA PE=1 SV=1 - [NACAM_HUMAN]	3,04	0,87	1	2	2	2	2078	205,3	9,58		
Ech03 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMS	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	172,43	51,40	1	22	25	43	644	66,0	8,12		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	96,18	27,40	1	14	14	26	584	58,8	5,21		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	104,13	31,62	1	7	7	19	623	62,0	5,24		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 épidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	69,48	27,86	1	8	11	18	639	65,4	8,00		
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT16B PE=1 SV=5 - [K2C6B_HUMAN]	38,38	13,12	1	2	6	11	564	60,0	8,00		
P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT16C PE=1 SV=3 - [K2C6C_HUMAN]	37,53	15,43	1	4	7	10	564	60,0	8,00		
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]	20,86	12,71	1	4	5	7	590	62,3	7,74		
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]	23,12	15,86	1	4	4	5	473	51,2	5,05		
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	5,73	8,53	2	2	2	2	375	41,7	5,48		
P15924	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 - [DSP_HUMAN]	5,85	1,22	1	2	2	2	2871	331,6	6,81		
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	8,94	7,84	1	2	2	2	472	51,5	5,16		

Ech04 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	62,93	28,26	1	13	13	18	644	66,0	8,12		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	58,02	26,65	1	7	7	12	623	62,0	5,24		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	30,62	15,58	1	5	5	8	584	58,8	5,21		
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	12,46	10,59	1	3	3	3	472	51,5	5,16		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	11,52	3,60	1	2	2	3	639	65,4	8,00		
H0YIN9	Keratin, type II cytoskeletal 5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=1 - [H0YIN9_HUMAN]	10,13	11,22	3	2	2	3	196	22,0	5,16		
Ech05 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	68,25	31,21	1	10	11	16	644	66,0	8,12		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	55,81	21,75	1	9	9	15	584	58,8	5,21		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	30,94	10,80	1	4	5	8	639	65,4	8,00		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	19,15	8,67	1	2	2	3	623	62,0	5,24		
Q9BYK8	Helicase with zinc finger domain 2 OS=Homo sapiens GN=HELZ2 PE=1 SV=6 - [HELZ2_HUMAN]	10,72	1,21	1	2	2	3	2649	294,5	7,49		
Ech06 , Fixed Value , 2 peptides par protéine , HV , rank1												
Ref-Human_201605												
Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI		
Q9BYK8	Helicase with zinc finger domain 2 OS=Homo sapiens GN=HELZ2 PE=1 SV=6 - [HELZ2_HUMAN]	171,35	19,21	1	30	30	42	2649	294,5	7,49		
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	83,97	22,36	1	9	10	20	644	66,0	8,12		
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]	47,45	22,62	1	5	6	10	473	51,2	5,05		
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	46,15	17,29	1	6	6	11	584	58,8	5,21		
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	39,40	16,69	1	5	5	9	623	62,0	5,24		
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]	28,21	13,62	1	3	3	5	639	65,4	8,00		
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]	24,30	13,12	2	4	5	6	564	60,0	8,00		
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]	21,44	12,92	1	3	4	6	472	51,5	5,16		
A6PKV7	Uncharacterized protein C9orf84 OS=Homo sapiens GN=C9orf84 PE=4 SV=1 - [A6PKV7_HUMAN]	5,79	2,70	1	2	2	2	1370	157,0	5,50		
H7C4H8	Histone RNA hairpin-binding protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLBP PE=1 SV=1 - [H7C4H8_HUMAN]	3,23	8,06	1	2	2	2	186	21,3	10,11		
A0A0A0MRA1	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=1 - [A0A0A0MRA3_HUMAN]	3,16	0,06	3	2	2	2	27118	3012,1	6,71		

HELZ2, une nouvelle ribonucléase humaine impliquée dans le métabolisme des ARN ?

Résumé

Il existe deux types d'ARN : les ARN messagers qui sont des ARN codants, et les ARN non codants. La machinerie responsable de la dégradation des ARN qui ne sont plus nécessaires ou qui sont endommagés contribue au contrôle de l'expression des gènes chez tous les organismes vivants. Les ribonucléases sont les enzymes catalytiques de cette machinerie. Leur caractérisation est donc cruciale pour comprendre la manière dont les cellules adaptent leurs programmes d'expression génétique en fonction des signaux extracellulaires. Dans cette thèse, une nouvelle ribonucléase humaine appelée HELZ2 a été identifiée et caractérisée. Ses capacités à dégrader l'ARN ainsi qu'à hydrolyser l'ATP *in vitro* ont été démontrées. Les caractéristiques de son domaine nucléase appelé RNB ont été décrites. Sa localisation, majoritairement cytoplasmique a aussi été démontrée. Cette étude lie clairement la protéine HELZ2 au métabolisme des ARN permettant d'étudier ses fonctions *in vivo* sous un nouvel angle.

Mots-clés : HELZ2, ribonucléase, RNase, hélicase

Résumé en anglais

Two types of RNAs are known: messenger RNAs that are coding RNAs, and non-coding RNAs. The machinery of RNA decay which degrades damaged RNAs and those that are no longer needed contributes to the control of gene expression in all living organisms. Ribonucleases are the catalytic enzymes of this machinery. Their characterization is therefore crucial to understand how cells adapt their gene expression programs to extracellular signals. In this thesis, a new human ribonuclease called HELZ2 has been identified and characterized. Its ability to degrade RNA as well as to hydrolyze ATP *in vitro* has been demonstrated. The characteristics of its nuclease domain called RNB have been described. Its predominantly cytoplasmic localization has also been demonstrated. This study clearly links HELZ2 protein to the RNA metabolism providing a new angle to study its functions *in vivo*.

Keywords: HELZ2, ribonuclease, RNase, helicase