



HAL
open science

Rôle du système HSP90/R2TP dans l'assemblage du complexe TSC et la régulation de la voie mTORC1

Claire Abeza

► **To cite this version:**

Claire Abeza. Rôle du système HSP90/R2TP dans l'assemblage du complexe TSC et la régulation de la voie mTORC1. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT019 . tel-03346460

HAL Id: tel-03346460

<https://theses.hal.science/tel-03346460>

Submitted on 16 Sep 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.

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

En Biochimie et biologie moléculaire

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

Unité de recherche UMR5535- Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

Rôle du système HSP90/R2TP dans l'assemblage du complexe TSC et la régulation de la voie mTORC1

Présentée par Claire ABEZA

Le 10 Juin 2021

Sous la direction de Céline VERHEGGEN

Devant le jury composé de

Philippe MEYER, Directeur de Recherche, UMR8226, IBPC, Paris
Mario PENDE, Directeur de Recherche, Inserm U1151, Université de Paris, Paris
Carmen GARRIDO, Directrice de recherche, Inserm U866, Faculté de Médecine
Céline VERHEGGEN, Directrice de Recherche, IGH, Montpellier
Edouard BERTRAND, Directeur de Recherche, IGH, Montpellier

Rapporteur, Président
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Invité

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier Philippe Meyer, Mario Pende et Carmen Garrido, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'examiner mes travaux de thèse.

Merci à La Ligure Nationale Contre le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale, pour le financement de mes cinq années de thèse.

Un immense merci à Philippe et Dominique qui ont fait parti de mon comité de thèse durant ces cinq années. Merci pour votre soutien et votre disponibilité quel que soit la difficulté ou le problème rencontré. Merci pour tous vos précieux conseils qui m'ont toujours poussée en avant et permis de m'améliorer au fil des ans.

Merci à Édouard de m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Merci pour les conseils scientifiques qui m'ont permis d'optimiser les expériences.

Céline, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de vivre cette belle aventure. Merci pour tous les conseils lors des nombreuses répétitions avant chaque oral. Tu as su m'apprendre la rigueur qu'exige cet exercice, et le niveau d'anglais qui va avec... Je ne crois pas t'avoir vu stresser un seul jour en cinq ans (même pas après l'annonce de ma grossesse !) et ce calme m'a permis d'avancer sans perdre l'objectif final. Ça n'a pas tous les jours été facile, surtout avec la crise sanitaire ou le déménagement en fin de thèse !!! Merci pour les innombrables heures passées à corriger ce manuscrit et le papier. Même à distance ton soutien a été précieux, alors merci encore.

Merci à ma deuxième famille, tous les membres, passé et présent, de l'équipe Edouard Bertrand. En cinq ans j'en ai vécu des choses à vos côtés... On a ri, pleuré, discuté autour de milliers de cafés, échangé des astuces de paillasse ou de paperasse !!!

Merci Chloé, Alja et Viviana. Pour toutes les explications sur les commandes, les produits, les manip mais surtout les sorties et les apéros pour décompresser (à l'époque il était encore possible de se retrouver autour d'une bière). Je vous aime fort les filles, et Ethan (alias Choupi) aussi !

Merci Emeline. Tu es une fille tellement organisée que j'ai dû me mettre à niveau pour ne pas paraître à la traîne ! Merci surtout d'avoir été là quand ça n'allait pas et d'avoir trouvé les mots (et les gâteaux) qu'il fallait pour me remonter le moral. Merci simplement d'être toi. La fin de cette thèse ne signera certainement pas la fin de notre amitié !

Merci Xavier et MC. Vous avez été mes piliers dans le labo. Quelque soit la question ou le moment, vous vous êtes toujours rendu disponible pour chercher avec moi la solution à mon problème. Merci pour votre gentillesse, votre patience et tous nos moments « off ». Je ne pourrai plus faire un squat ou une pompe sans penser à vous maintenant !

Merci également à tous les autres membres de cette équipe avec qui j'ai partagé cette aventure. A ceux qui m'ont vu « grandir » comme à ceux que je n'ai que croisé sur la fin. Merci aux nombreux croissants du matin et au chocolat et autres gourmandises toujours présentes à côté de la machine à café. Ma ligne en a pris un coup mais ces petits moments de partage sont toujours agréables et nous permette d'être une famille plus qu'une équipe.

Ensuite je voudrai remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées pendant ma thèse. D'abord un immense merci à Françoise qui se démène tous les jours pour aider les étudiants avec leurs démarches administratives. Mon congés maternité n'aurait jamais pu être reconnu sans ton acharnement de même que la signature de tous mes avenants. Merci d'avoir était là pour moi et pour tous les autres doctorants de l'IGMM. Nous ne pourrons jamais te remercier à la hauteur de tes efforts.

Claire, Amandine, Chris, sans vous je n'aurai jamais atterrie dans un labo ! Vous êtes mes compagnons de Fac et certainement de bons amis pour la vie. Merci pour les sessions brainstorming à la BU, les soirées jeux ou encore les séjours dans ta si belle région Claire ! Faudra que je revienne faire du vélo avec ton père mais cette fois il y a des chances que ça soit moi qui traîne la patte !!!

Merci aussi à Danièle ma mentor du programme « Femmes et Science ». Moi qui étais très stressée au début de ma thèse, tu m'as permis de prendre du recul et de ne pas oublier qu'il faut un bon équilibre entre vie professionnelle et vie privée pour tenir bon longtemps ! Merci à May d'avoir mis en place sur Montpellier ce programme qui a aidé et aidera un grand nombre d'entre nous à nous épanouir dans le monde de la recherche.

Merci à toutes les personnes de l'IGMM parties ou encore présentes avec qui j'ai partagé de super moments qui ont rendu plus agréables ces années de thèse. Les pauses cafés, les pots des thésards, les soirées jeux ainsi que le pot après le séminaire interne et toutes les discussions scientifiques enrichissantes.

Merci à tous les membres des différentes plateformes qui ont soutenu mon travail. A MGC, merci à Sylvie et Fred pour tous les clonages souvent demandés en urgence... Vous m'avez fait gagner un temps précieux merci à vous deux ! A MRI, merci à Myriam et Stéphanie de l'équipe de cytométrie pour les nombreux tri cellulaires. Merci également à Benoit d'avoir partagé ses super pipettes électroniques sans lesquelles je serai certainement encore en train de pipeter le échantillons ! Merci aussi à toute l'équipe microscopie pour le soutien technique et les formations sur les différents microscopes. Merci à la FPP pour l'analyse des SILAC et notamment à Franck pour ses analyses et sa disponibilité quand j'avais une question naïve à poser. A SERENAD, merci Thierry de m'avoir réconciliée avec R. Ce n'était pas gagné et pourtant grâce à toi j'ai pu réaliser toutes les analyses et faire les graphes (presque) sans effort. Merci pour ton temps, ta patience et ta

disponibilité.

Enfin merci aux personnes extérieures à l'institut mais qui ont quand même fait partie de cette aventure. A mes petits scouts que j'ai du confier à quelqu'un d'autre le temps de ma thèse. A mes partenaires de sport avec qui j'ai pu évacuer toutes mes tensions ! Et évidemment à ma famille. Merci maman d'avoir lu l'intégralité de cette thèse pour en corriger les fautes sans comprendre la plupart du vocabulaire... Merci à toi et à papa pour votre soutien dans notre quotidien parfois chaotique...

Et merci à toi Mat. Toi mon compagnon qui n'a pas toujours compris mon acharnement et mes problématiques mais qui a toujours tout écouté. J'aimerais pouvoir dire qu'après cinq années mon « monde » te paraît moins mystérieux mais j'en doute... Ces derniers mois d'écriture n'ont pas été facile pour notre vie de famille mais toi et Ethan m'avez permis de ne pas me noyer. Alors je clôture ce chapitre de notre vie et nous allons pouvoir tous les trois en commencer un nouveau.

Et à tout ceux que j'ai oublié mais qui savent qu'ils ont compté !

ABRÉVIATIONS

17-AAG : 17- allylamino- 17 demethoxygeldanamycin

AAA+ ATPase : *ATPase associated with diverse cellular activities*

ADP : *Adenosine DiPhosphate*

Aha1 : *Activator of Hsp90 ATPase protein 1*

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

ATM : *Ataxia–Telangiectasia Mutated*

ATG13 : *Mammalian autophagy-related gene 13*

ATP : *Adenosine TriPhosphate*

ATPase : enzyme catalysant l'hydrolyse de l'ATP

ATR : *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*

Bnip3 : *Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa protein- Interacting Protein 3*

Bud27 : *Bud site selection protein 27*

CBC : *Crypt Base Columnar*

CBP80 : *Cap-Binding Protein 80*

Cdc37 : *Cell division cycle protein 37*

CHIP : *C-terminus of the Hsc (heat-shock cognate) 70-interacting protein*

CK2 : *Caseine Kinase 2*

CTA : *C-terminal TransActivation*

CTD : *C-Terminal Domain*

CS : *CHORD et SGT*

DBD : *DNA Binding Domain*

DKC1 : *dyskérine*

DNA : *DesoxyriboNucleic Acid*

DNA-PKcs : *DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*

eEF1A : *eukaryotic Elongation Factor 1A*

eEF2K : *eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase*

eIF4B : *eukaryotic Translation Initiation Factor 4B*

eIF4E : *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

eIF4E-BP1 : *EIF4E binding protein 1*

FKBP52 : *FK506-binding protein 52*

FBL : *Fibrillarin*

FIP200 : *Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*

FRAP : *FKBP12-rapamycin-associated protein*

GA : *geldanamycine*

GAP : *GTPase Activating Protein*

GAPDH : *GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase*

Gim1 : *GimC subunit 1*

Gim4 : *GimC subunit 4*

Grp94 : *94 kDa glucose-regulated protein*

GSK3-β : *Glycogen Synthase Kinase 3β*

HDACs : *Histone DeAcetylases*
HIF-1 α : *Hypoxia-Inducible Factor*
HK2 : *Hexokinase 2*
HNSCC : *head and neck squamous cell carcinoma*
HOP : *HSP70/HSP90 Organizing Protein* ou **Sti1** chez la levure
HSE : *Heat Shock Elements*
HSP : *Heat Shock Protein*
HSP70 : *Heat Shock Protein 70*
HSP90 : *Heat Shock Protein 90*
HSF : *Heat Shock Factor*
HSF1 : *Heat Shock Factor 1*
HSR : *Heat Shock Response*
HtpG : *High temperature protein G*
IFN- γ : *interféron- γ*
IL-6 : *InterLeukine-6*
IL-R : *récepteur interleukine*
IKK : *Inhibitor KappaB Kinase*
INO80 : *Inositol biosynthesis genes 80*
LKB1 : *Liver kinase B1*
LUMIER : *luminescence-based mammalian interactome mapping*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*
MCRS1 : *microspherule protein 1*
MD : *Median Domain*
MPT : *modification post-traductionnelle*
MRN : *Mre11-Rad50-Nbs1*
mRNP : *Messenger ribonucleoprotein*
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
mTORC1 : *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*
mTORC2 : *mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*
NF1 : *neurofibromatosis 1*
NF-IL6 : *Nuclear Factor for IL-6*
NF- κ B : *Nuclear Factor κ B*
NF- κ B : *Nuclear Factor κ B*
Nop17 : *Nucleolar protein 17*
NOP56 : *Nucleolar protein 56*
NOP58 : *Nucleolar protein 58*
NTD : *N-Terminal Domain*
PAQosome : *Particle for Arrangement of Quaternary structure*
PDCD4 : *Programmed Cell Death 4*
PDRG1 : *p53 and DNA damage regulated 1*
PFDN2 : *Prefoldin subunit 2*
PFDN6 : *Prefoldin subunit 6*

Pih1 : *Protein interacting with HSP90* ou **PIH1D1** chez l'homme

PIH1 : *PIH1 homology domain*

PIH1D1 : *Protein Interacting with HSP90 Domain containing protein 1* ou **Pih1** chez la levure

PIKK : *Phosphatidylinositol 3-Kinase-like Kinases*

POLR2E : *RNA polymerase II subunit E*

POLR2M : *RNA polymerase II subunit M*

PP2A : *Protein Phosphatase 2A*

PRPF8 : *Pre-mRNA-Processing Factor 8*

PTEN : *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

RD : *Regulatory Domain*

RG : récepteurs aux glucocorticoïdes

RNAP : *RNA polymerase*

RNP : *Ribonucleoprotein*

R2TP : *Rvb1–Rvb2–Tah1–Pih1*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RPAP3 : *RNAP II associated protein 3* ou **Tah1** chez la levure

RPB1 : *RNA polymerase II subunit B1*

RPB5 : *RNA polymerase II subunit B5*

RuvBL1 : *RuvB-like AAA ATPase 1*

RuvBL2 : *RuvB-like AAA ATPase 2*

S6K1 : *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*

SGK1 : *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*

SMG1 : *Suppressor of Morphogenesis in Genitalia 1*

snRNA : *small nuclear RNA*

snRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*

snoRNP : *small nucleolar ribonucleoprotein*

STAT-3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

Strap : *Stress-Responsive Activator of p300*

SNU13 : *Small nuclear ribonucleoprotein 13*

SPAG1 : *Sperm-associated antigen 1*

Spt5 : *Suppressor of ty 5*

STAP1 : *SKP2-associated alpha prefoldin 1*

Tah1 : *TPR repeat-containing protein Associated with HSP90* ou **RPAP3** chez l'homme

TBC1D7 : *Tre2-Bub2-Cdc16 domain family member 7*

Tel2 : *Telomere maintenance 2*

TFIIB : *Transcription factor IIB*

TFIIF : *Transcription factor IIF*

TIF-IA : *Transcriptional Initiation Factor IA*

TIP48 : *TBP-interacting protein 48*

TIP49 : *TBP-interacting protein 49*

TIP60 : *TAT-interactive protein 60 kDa*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

TPR : *Tetratricopeptide Repeat*

TRAP1 : *Tumor necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1*

TRRAP : *Transformation/Transcription domain-Associated Protein*

TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*

TSC1 : *Tuberous Sclerosis Complex 1*

TSC2 : *Tuberous Sclerosis Complex 2*

TTI1 : *TEL2 interacting protein 1*

TTI2 : *TEL2 interacting protein 2*

TTT : *TEL2-TTI1-TT2 Complex*

ULK1 : *unc-51-like kinase1*

URI1 : *Unconventional prefoldin RNA Polymerase Binding subunit 5 (RPB5) interactor 1*, aussi connu sous le nom de RPB5-Mediating Protein (RMP)

UXT : *Ubiquitously expressed transcript*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

WDR92 : *WD-40 repeat domain 92*

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Domaines des membres de la famille HSP90 chez l'homme.	15
Figure 2 : Schéma du cycle ATPase de HSP90.	18
Figure 3 : Intégration des voies de signalisation dans le contrôle de l'expression HSP90.....	22
Figure 4 : Mécanisme de repliement des protéines par HSP90.	28
Figure 5 : Composition du complexe préfoldine (PFD).....	30
Figure 6 : Composants du PAQosome humain et leur homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	34
Figure 7 : Structure de domaine PIH-N et interactions Tel2.....	39
Figure 8 : Structure de la protéine RPAP3.....	41
Figure 9 : Séquence et structure de RUVBL1 et RUVBL2 chez l'homme.....	45
Figure 10 : Composants des complexes associés à Pontine et Reptine.....	49
Figure 11 : Schéma de la structure du PAQosome avec ses adaptateurs et ses clients.....	50
Figure 12 : Assemblage des snRNP U4 et U5.....	53
Figure 13 : Prise en charge des PIKK par le système HSP90/R2TP via le complexe TTT.....	56
Figure 14 : Structures des membres de la famille des PIKK et leurs fonctions cellulaires en condition de stress.....	62
Figure 15 : Structure et fonction de mTORC1 et mTORC2.	65
Figure 16 : Structure du complexe TSC chez l'homme.....	69
Figure 17 : Régulation de Rheb.....	71
Figure 18 : Régulation du complexe TSC et intégration des signaux cellulaires.....	75
Figure 19 : Model de la régulation de l'activité de mTORC1 et de la croissance cellulaire par REDD1.....	77
Figure 20 : Régulation de la localisation et de l'activation de mTORC1.....	80
Figure 21 : Analyse de la phosphorylation des composants de la voie AKT/mTOR.....	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des fonctions des sous-unités du PAQosome.....32

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
ABRÉVIATIONS.....	5
LISTES DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE 1 - La protéine HSP90 et son co-chaperon le complexe R2TP.....	14
I.La protéine chaperon HSP90.....	14
A.Généralités.....	14
1.Classification des HSPs.....	14
2.La structure et cycle catalytique de HSP90.....	16
B.Régulation des fonctions d'HSP90.....	19
1.HSF1, premier régulateur de HSP90.....	19
2.Régulation de l'expression génique de HSP90.....	20
3.Régulation post-traductionnelle de HSP90.....	23
4.Régulation de l'activité ATP de HSP90 par les co-chaperons.....	24
i.Aha1.....	24
ii.Sti1/HOP.....	25
iii.Cdc37.....	25
iv.Tah1 et Pih1.....	25
5.Régulation de l'activité de HSP90 par la modification post-traductionnelle des co-chaperons.....	26
C.Rôles de HSP90 dans l'organisme.....	26
1.La réponse cellulaire au stress.....	26
2.Rôle de HSP90 dans l'assemblage des protéines.....	27
II.Le PAQosome, co-chaperon de HSP90.....	29
A.Découverte du R2TP/PAQosome.....	29
B.Structure et mécanismes d'action du PAQosome.....	33
C.Sous-unités du R2TP.....	36
1.PIH1D1 (Pih1p, Nop17).....	36
2.RPAP3 (Tah1p, Spag1).....	40
3.RUVBL1/RUVBL2 (Rvb1/Rvb2, Pontine/Reptine, TIP49/TIP48).....	43
D.Les substrats du système HSP90/ R2TP.....	50

1.Assemblage des snRNP U4 et U5 par le système HSP90/R2TP.....	51
2.Assemblage des PIKK par le système HSP90/R2TP.....	54
3.D'autres substrats du système HSP90/R2TP.....	57
CHAPITRE 2 - Les voies de signalisation PI3K/mTOR.....	61
I.Organisation des complexes mTOR.....	61
A.mTORC1.....	63
B.mTORC2.....	66
II.Le complexe TSC.....	67
A.Généralités.....	67
B.Rheb, la cliente de TSC2.....	70
C.Le complexe TSC, le senseur des signaux cellulaires.....	73
1.Réponse du complexe TSC aux facteurs de croissance.....	73
2.Réponses du complexe TSC aux niveaux d'énergie et d'oxygène.....	76
III.Activation de mTORC1 au niveau des lysosomes.....	78
CHAPITRE 3 - Implications du PAQosome et de la voie mTOR dans les cancers	81
I.HSP et échappement tumoral.....	81
A.Rôle de HSP90 dans la cancérogenèse.....	81
B.Inhibition de HSP90.....	82
C.HSP90 et résistance aux traitements anti-cancéreux.....	85
II.Rôle du R2TP dans le cancer.....	86
A.Les RUVBL dans la cellule cancéreuse.....	86
1.Expression et rôle des RUVBL.....	86
2.RUVBL : Biomarqueurs cancéreux et cibles thérapeutiques.....	87
B.RPAP3 et cancers colorectaux.....	89
C.Rôle des PFDL dans le cancer.....	90
III.La voie mTOR dans la cancérogenèse.....	91
A.Altérations des voies de signalisation en amont de mTOR.....	91
B.Mutations oncogéniques de la protéine mTOR.....	92
C.Traitements anticancéreux ciblant mTOR.....	92
OBJECTIFS.....	94
RÉSULTATS.....	96
ARTICLE 1 : HSP90/R2TP system works as a platform for assembly of TSC	

complex.....	96
Résumé.....	96
Résultats non inclus dans l'article de thèse.....	98
ARTICLE 2 : Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones.....	139
Résumé.....	139
Contribution personnelle.....	141
ARTICLE 3 : The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones.....	165
Résumé.....	165
Contribution personnelle.....	167
ARTICLE 4 :The HSP90/R2TP assembly chaperone promotes cell proliferation in the intestinal epithelium.....	197
Résumé.....	197
Contribution personnelle.....	199
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	260
A.PIH1D1 : un facteur important du R2TP pour la reconnaissance des substrats.....	261
B.Le complexe TSC : un mécanisme d'assemblage complexe.....	262
1.TBC1D7, une sous-unité à part.....	262
2.TSC1 et TSC2 sont recrutés de manière indépendante sur le système HSP90/R2TP.....	263
C.Rôle de HSP90 de RPAP3 et des RUVBL dans le recrutement des substrats.....	264
D.L'assemblage de la particule U5 : exemple d'une interaction canonique avec PIH1D1 mais stabilisée par le co-facteur ZNHIT2.....	265
E.D'autres complexes R2TP-like pourraient avoir des mécanismes de reconnaissance des substrats similaires au R2TP.....	267
F.Rôle du R2TP dans l'homéostasie des tissus.....	267
G.mTOR, TSC et HSP90 dans les cancers.....	268
BIBLIOGRAPHIE.....	270

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 - La protéine HSP90 et son co-chaperon le complexe R2TP

I. La protéine chaperon HSP90

A. Généralités

1. Classification des HSPs

Les protéines de choc thermique (« *Heat Shock Protein* » ou HSP) constituent une grande famille de chaperons moléculaires classés selon leur masse moléculaire, et comprennent HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 et HSP90. Les HSP agissent selon divers processus physiologiques et protecteurs pour aider à maintenir l'homéostasie cellulaire. En particulier, les HSP participent aux processus de repliement et de maturation des protéines sous divers facteurs de stress tels que le choc thermique, l'hypoxie et la dégradation.

Initialement les protéines chaperons ont été caractérisées chez la drosophile avec hsp83 avant que leur homologues ne soient identifiés dans d'autres espèces (*Kelley and Schlesinger, 1982*). Chez les eucaryotes, les différentes isoformes de HSP90 sont retrouvées aussi bien dans le cytosol que dans le noyau et les organelles comme la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique. Dans le cytoplasme on retrouve deux isoformes : HSP90 β (HSP90AB1) exprimé de façon constitutive et HSP90 α (HSP90AA1) inducible à la chaleur (*Ammirante, 2008*) respectivement Hsp82 et Hsc82 chez la levure (*Csermely, 1998*). On retrouve des isoformes spécifiques de la mitochondrie comme la protéine TRAP1 ou spécifiques du réticulum endoplasmique avec la protéine Grp94 (*Frey, 2007*) (**Figure 1A**). Des isoformes de Hsp90 existent dans d'autres espèces comme Hsp90C dans les chloroplastes (*Schmitz, 1996*) et HtpG chez *E. Coli* (*Bardwell and Craig, 1987*). HSP90 est également sécrété et retrouvé à la surface des cellules (*Ullrich, 1986 ; Tsutsumi and Neckers, 2007*).

La protéine HSP90 représente 1 à 2% des protéines de la cellule (*Ferrarini, 1992*) et ce pourcentage peut augmenter jusqu'à 4 à 6% dans les cellules en état de stress (*Picard, 2002*). La protéine HSP90 est une protéine chaperon essentielle impliquée dans le repliement et la stabilisation de substrats appelées protéines clientes. Elle participe à diverses fonctions cellulaires incluant le contrôle de cycle cellulaire ou la réponse cellulaire après un stress (*Miyata, 2013*) dont nous discuterons dans un prochain paragraphe. HSP90 est responsable de la maturation des principales protéines de signalisation, y compris les kinases régulatrices (*Hořejší, 2010*), les récepteurs

hormonaux stéroïdiens (Pratt, 2006) et les facteurs de transcription (Pratt, 1998). HSP90 est impliqué dans l'assemblage et la dégradation de complexes protéiques (Makhnevych and Houry, 2012) et peut supprimer la variation phénotypique (Rutherford and Lindquist, 1998 ; Lindquist, 2009). Ensemble, HSP90 α et HSP90 β interagissent avec environ 10% du protéome eucaryote (Zhao, 2005), ce qui représente environ 2000 protéines (Echeverría, 2011). HSP90 est donc impliqué dans un large éventail de processus biologiques (Taipale, 2010) d'où la nécessité d'avoir une grande variété de mécanismes régulant ses fonctions.

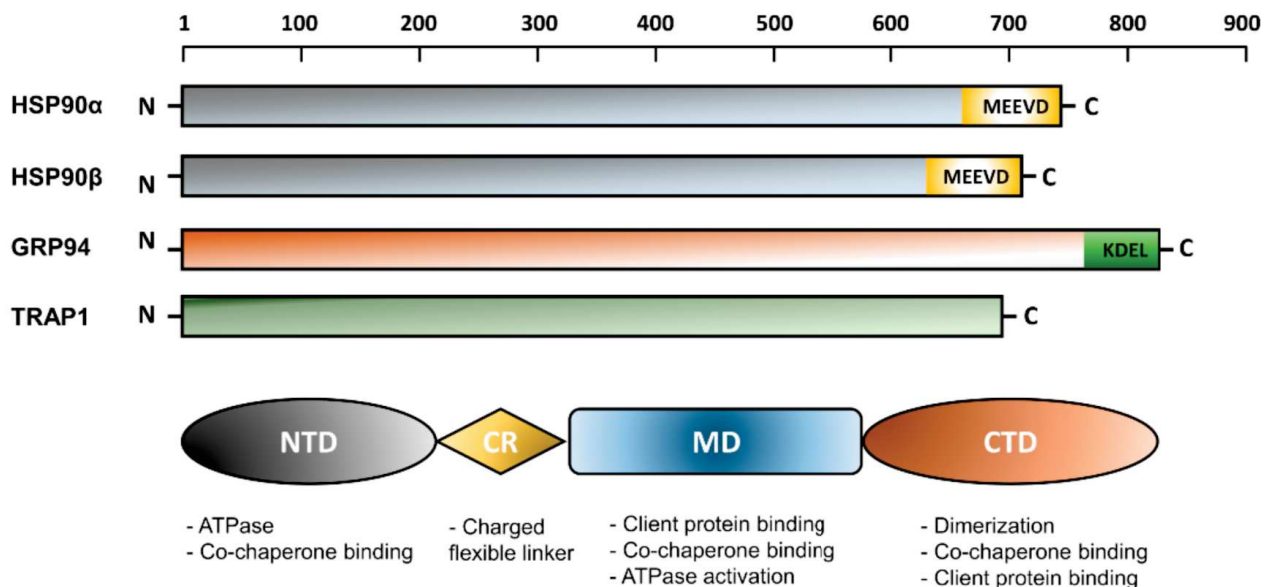


Figure 1 : Domaines des membres de la famille HSP90 chez l'homme.

La numérotation correspond aux acides aminés. Les longueurs de HSP90a, HSP90b, GRP94 et TRAP1 sont de 732, 724, 704 et 803 acides aminés respectivement. Est montré en dessous une représentation schématique de la structure des domaines des isoformes de HSP90 avec la fonction biologique de chacun en dessous.

Tiré de Hoter, 2018

2. La structure et cycle catalytique de HSP90

HSP90 se compose de trois domaines : un domaine N-terminal (NTD), responsable de liaison à l'ATP, qui est connecté à un domaine Médian (MD) via un linker non structuré, et le domaine C-terminal (CTD), qui est responsable de la dimérisation de la protéine (**Figure 1**). Le domaine NTD est très conservé au niveau de l'extrémité fixant l'ATP/ADP (*Prodromou, 1997*). Pour démontrer l'importance de l'ATP pour le fonctionnement de HSP90, les résidus responsables de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP ont été mutés chez la levure *S. cerevisiae*. Ceci a entraîné une diminution drastique de la viabilité des levures (*Panaretou, 1998*). Le domaine MD est impliqué quant à lui dans l'interaction avec les protéines clientes de HSP90. Les isoformes HSP90AA et HSP90AB chez l'homme diffèrent de quelques résidus au niveau de ce domaine (*Synoradzki and Bieganowski, 2015*).

Le domaine CTD permet la dimérisation de HSP90 (*Minami, 1994*). Lorsque ce domaine est absent, on observe un important ralentissement de l'activité catalytique de HSP90 ce qui suggère que la dimérisation est importante pour l'activité de la protéine (*Harris, 2004*). C'est aussi via ce domaine CTD que se fait le recrutement des certains co-chaperons qui vont moduler l'activité de HSP. En effet, la séquence MEEVD (Met-Glu-Glu-Val-Asp) en CTD de HSP90 va être reconnue par un domaine appelé TPR, pour « *Tetratricopeptide Repeat* », par les co-chaperons. Ces domaines TPR, ont plusieurs répétitions d'une séquence consensus (34 acides aminés repliés en hélice-boucle-hélice). Cette séquence, AEAWFGLGHIYEKLGDLKALDAFQ- -KALLLDPNN, a été déterminée à partir de cinq protéines (CDC23, Nuc21, CDC16, SSN6, SKI3) ayant chacune plusieurs motifs TPR. Les résidus en gras sont présents dans au moins 40% des TPR (*Sikorski, 1990*). L'interaction entre le ou les domaines TPR du co-chaperon et le motif MEEVD de la protéine HSP90 se fait via 5 résidus très conservés qui forment un motif nommé « *dicarboxylate clamp* », une pince dans laquelle l'extrémité MEEVD de HSP90 va s'insérer (*Russell, 1999 ; Scheufler, 2000 ; Schopf, 2017*).

Le domaine NTD seul n'est pas suffisant pour l'activité catalytique. En effet il a été montré que seul, ce domaine n'avait aucune activité d'hydrolyse de l'ATP car celle-ci est permise par quelques résidus présents dans le domaine MD (*Meyer, 2003*). Les deux domaines NTD et MD travailleraient donc de concert dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP en ADP. De plus, c'est le domaine CTD qui lie et recrute les co-facteurs à domaines TPR de HSP90.

La conformation de HSP90 détermine son activité mais aussi sa capacité à lier le substrat. La fixation de l'ATP et son hydrolyse induisent un changement conformationnel de HSP90. HSP90 va adopter une conformation « ouverte » en absence d'ATP (**Figure 2**). Dès fixation de l'ATP, HSP90 va progressivement aller vers une conformation « fermée ». La liaison de l'ATP favorise le

mouvement d'un segment à l'intérieur de chaque domaine NTD qui va se positionner comme un couvercle sur l'ATP liée (Ali, 2006). Le mouvement des couvercles expose des résidus de surface qui sont ensuite impliqués dans la dimérisation transitoire des domaines NTD de HSP90. L'activité ATPase de HSP90 est complète lorsque la boucle catalytique du domaine MD de HSP90 passe à un état actif « ouvert » (Meyer, 2003). Cette boucle possède un résidu d'arginine conservé (Arg380 dans la levure), qui interagit avec le γ -phosphate d'ATP, et favorise ainsi l'hydrolyse d'ATP par HSP90. La conformation active de la boucle catalytique est modulée par la liaison du co-chaperon Aha1 (Meyer, 2004). Les changements de conformation, y compris la fermeture du couvercle et la modulation de la boucle catalytique, représentent l'étape limitant la vitesse du cycle de chaperon de HSP90. HSP90 va stabiliser un dépliement local sur les protéines clientes. L'énergie fournie lors de l'hydrolyse de l'ATP participe quand à elle au relargage des clientes.

Les co-chaperons à domaines TPR lient HSP90 par des motifs et séquences connues. Ce n'est pas le cas de tous les co-chaperons dont certains possèdent plusieurs sites de liaison à HSP90 qui vont évoluer au cours du cycle de ce dernier (Roe, 2014 ; Verba, 2016) Pour les substrats, la fixation à HSP90 ne semble pas soumise à la séquence (Taipale, 2010). Les protéines clientes seraient donc reconnues par leur structure plutôt que par leur séquence. Différentes études ont montré que le chaperon pouvait lier différents clients (kinases, récepteurs aux hormones, protéines mal repliées) sur un même site (Vaughan, 2006 ; Karagöz, 2014).

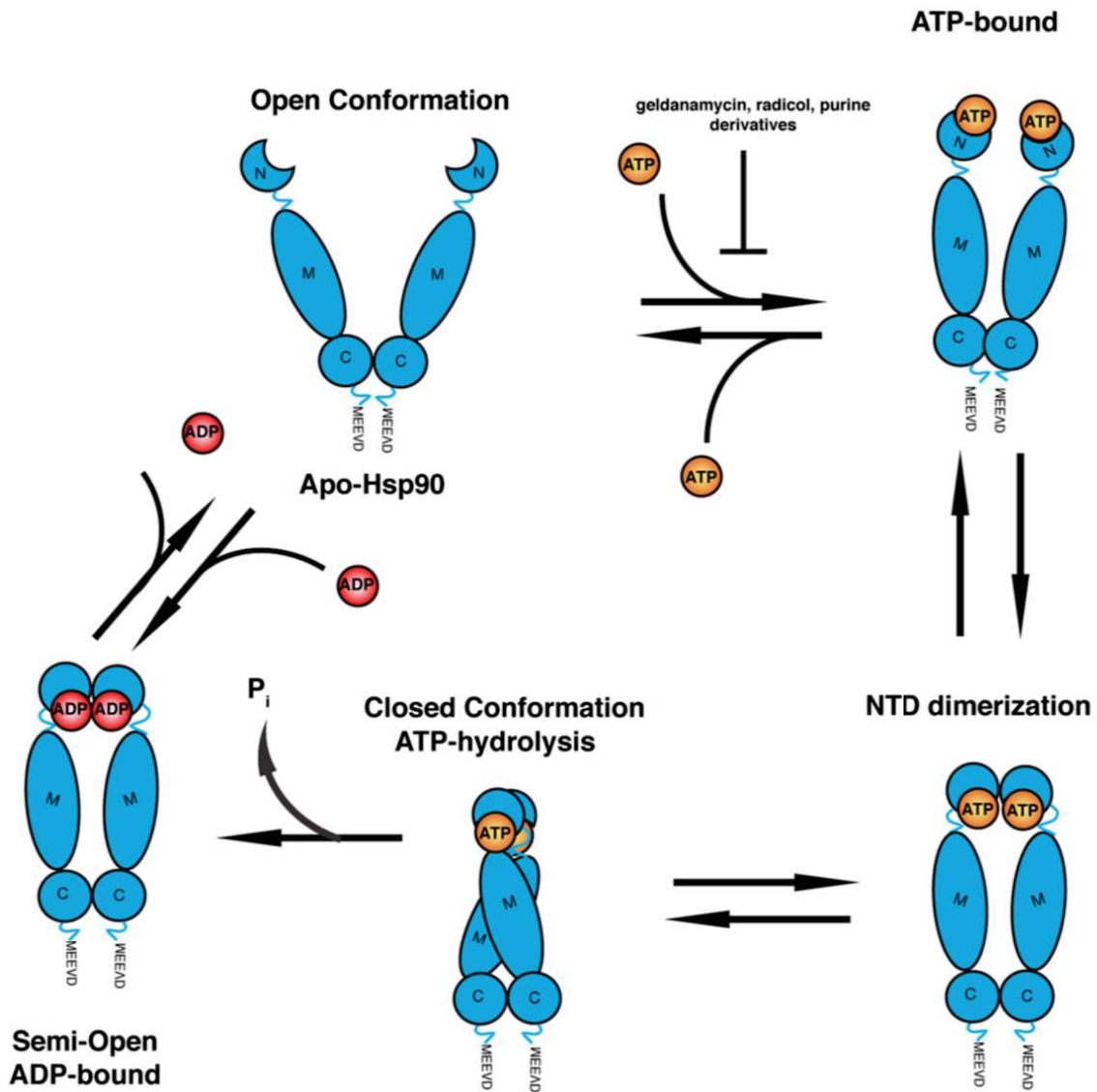


Figure 2 : Schéma du cycle ATPase de HSP90.

HSP90 sous forme homodimère adopte une conformation ouverte en forme de V. La liaison de l'ATP au site ATPase du domaine N-terminal induit un changement de conformation lorsque les « couvercles » se ferment et que l'ATP est fixé dans la poche de liaison nucléotidique. Ceci induit la dimérisation des domaines N-terminaux de chaque homodimère suivie de la fermeture de HSP90 et du recrutement du domaine M pour l'hydrolyse de l'ATP. Les dimères s'écartent dans un état intermédiaire semi-ouvert lié à l'ADP. Le départ de l'ADP dissocie les domaines N-terminaux pour permettre la répétition du cycle. Les inhibiteurs communs de HSP90 (geldanamycine, radicicole et dérivés purine) se lient au N-terminal sur le site de liaison à l'ATP.

Tiré de Lackie, 2017

B. Régulation des fonctions d'HSP90

HSP90 interagit avec plus de 10% des protéines cellulaires et est impliqué dans la majorité des processus cellulaires nécessaires à l'homéostasie. HSP90 est aussi essentiel dans les voies de signalisation. Pour cela une régulation fine et rapide est nécessaire. En raison de la clientèle diversifiée de HSP90, toute une variété de co-chaperons régule également son activité et certains sont directement responsables de la livraison de protéines client. Comme toutes les protéines, HSP90 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles (MPT) et son activité ATPasique peut également être régulée par ses co-chaperons (*Prodromou, 2016*).

1. HSF1, premier régulateur de HSP90

Les protéines HSF (« *Heat Shock Factors* ») sont responsables de la régulation de la réponse au stress thermique (*Pirkkala, 2001*). Ce stress peut être induit par une variété de stimuli, notamment une température élevée, une infection bactérienne ou virale ou un stress oxydatif (*Sorger, 1991*). Le régulateur le plus important est HSF1, qui est principalement responsable de la régulation positive de HSP90 en se liant à des HSE (« *Heat Shock Elements* ») dans le promoteur de HSP90. HSF1 est lui-même soumis à une variété de processus régulateurs et peut répondre de manière directe à des stress (*Prodromou, 2016*). HSF1 interagit également avec une variété de facteurs transcriptionnels qui aident à intégrer les signaux biologiques, qui à leur tour régulent HSP90 de manière appropriée. Comme toutes les protéines HSF, HSF1 se compose d'un DBD (« *DNA binding domain* »), d'un domaine de trimérisation composé de trois répétitions de fermeture éclair leucine (HR-A/B), d'une région HR-C, qui régule négativement le domaine HR-A/B, et d'un domaine CTA (« *C-terminal transactivation* ») qui est contrôlé négativement par le RD central (« *Regulatory Domain* ») (*Verghese, 2012*). Le DBD va lier les HSE qui se composent de plusieurs répétitions nGAAn (*Sakurai and Enoki, 2010*). La disposition de ces répétitions va favoriser la coopération entre les HSF venant se lier.

Pendant un stress, les protéines dénaturées s'accumulent (*Voellmy, 2005*). L'interaction entre HSP90 et les protéines clientes va induire un changement de conformation qui va libérer HSF1 de son interaction inhibitrice avec HSP90. Le monomère de HSF1 va alors devenir homo-trimérique et être importé dans le noyau pour se lier aux HSE (*Zuo, 1994*). Une série de phosphorylations sur HSF1 est nécessaire pour qu'il devienne un facteur de transcription actif (*Holmberg, 2002*). Une fois pleinement fonctionnel, HSF1 induit une transcription rapide de HSP90 ainsi que d'autres chaperons et co-chaperons comprenant HSP70, HSP40 et HSP27 (*Heimberger, 2013*).

Dans des conditions normales, le RD du HSF1 possède une capacité intrinsèque à détecter le stress thermique. La phosphorylation de certaines sérines (Ser303, Ser307 et Ser363) est un système

réprimant la transcription, tout en étant sensible au stress (*Anckar and Sistonen, 2011 ; Morimoto, 1997*). D'autres phosphorylations (Ser230, Ser326), au contraire, vont favoriser l'activité transcriptionnelle de HSF1 de manière basale et être plus abondantes en cas de stress thermique (*Holmberg, 2001 ; Boellmann, 2004*). Il existe de nombreuses kinases responsables de la phosphorylation de HSF1 (*Holmberg, 2002*), qui aident probablement à intégrer les signaux de différentes voies de signalisation. Des expériences suggèrent cependant qu'il est possible de dissocier la phosphorylation induite par le stress de HSF1 de son activation, suggérant que la signature de phosphorylation du HSF1 seule n'est pas un marqueur approprié pour l'activité de la protéine (*Budzyński, 2015*). Il faut également signaler que HSF1 était régulée par la sumoylation (*Anckar and Sistonen, 2007 ; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007*) et l'acétylation (*Westerheide, 2009*). En plus des modifications post-traductionnelles, d'autres mécanismes régulent HSF1. HSP90 pourrait jouer un rôle dans la répression de la trimérisation de HSF1 (*Morimoto, 2002*). De plus, HSP70 et HSP40 inhibent l'activité activatrice de la transcription de HSF1 (*Gómez, 2008*).

En résumé, HSF1 est le régulateur principal des niveaux de HSP90 dans les cellules. Ensemble, la régulation transcriptionnelle, les modifications post-transcriptionnelles, la trimérisation, la liaison coopérative aux HSE ou sa capacité à détecter le stress vont réguler HSP90. HSF1 va intégrer les signaux cellulaires afin de moduler le niveau des protéines de choc thermique (*Prodromou, 2016*).

2. Régulation de l'expression génique de HSP90

En plus de l'activation par HSF1, HSP90 β est régulé par les facteurs de transcription interleukin-6 (IL-6), NF-IL6 (« *Nuclear Factor for IL-6* ») et STAT-3 (« *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* ») (**Figure 3**). Les sites de liaison à l'ADN des protéines STAT sont très semblables à ceux de HSF1 (*Ehret, 2001*). De plus, STAT-1 et HSF1 peuvent interagir entre eux et induire une forte activation transcriptionnelle. STAT-3 et HSF1 semblent incapables d'interagir et se concurrencent l'un l'autre, ce qui réduit l'expression de HSP90 β (*Stephanou, 1999*). Cela conduit à un système régulateur où l'activation STAT-1 et STAT-3 entraîne l'activation des promoteurs de HSP90 β , alors que l'interaction avec HSF1 peut moduler l'expression soit positivement ou négativement. Il est probable que STAT-1 et STAT-3 jouent un rôle important dans la régulation de HSP90 β dans des conditions normales, et leur interaction avec HSF1 permet d'intégrer leurs réponses à la réponse au stress (*Stephanou and Latchman, 1999*).

L'expression de HSP90 humain est augmentée par Strap (« *Stress-responsive activator of p300* »), un cofacteur de la transcription responsable du contrôle de la réponse aux dommages à l'ADN (**Figure 3**). Strap est connue comme une protéine inductible par choc thermique qui forme un complexe associé à la chromatine avec HSF1, et le co-activateur p300. Ce dernier a une activité acétylase d'histone et est nécessaire pour l'activation par certains facteurs de transcription (*Ito,*

2001).

Le gène de HSP90 α est sous le contrôle de NF- κ B (**Figure 3**). La famille des facteurs de transcription NF- κ B régule l'expression d'une grande variété de gènes impliqués dans un certain nombre de processus cellulaires tels que l'inflammation, la réponse immunitaire, la croissance et le développement des cellules, et est activée comme réponse à une variété de signaux, y compris les cytokines, les agents pathogènes, les blessures et autres conditions de stress (*Li and Verma, 2002 ; Napetschnig and Wu, 2013*). Une seule séquence consensus de NF- κ B (GTA GTT CCA) a été identifiée dans la région du promoteur HSP90 α (mais pas dans HSP90 β). La fixation de NF- κ B à ce site semble réguler à la hausse l'expression de HSP90 α . Les résultats suggèrent que HSP90 α est nécessaire non seulement pour la biosynthèse de l'IKK (*Broemer, 2004*), mais aussi pour l'expression constitutive et inductible de l'IKK et de la NF- κ B (*Pittet, 2005*). Ainsi, l'activité de NF- κ B influence l'expression du gène HSP90 α , mais les interactions réciproques entre les activités de HSP90 α et de NF- κ B sont susceptibles de constituer une boucle régulatrice qui peut influencer la survie cellulaire et la réponse aux agents stressants.

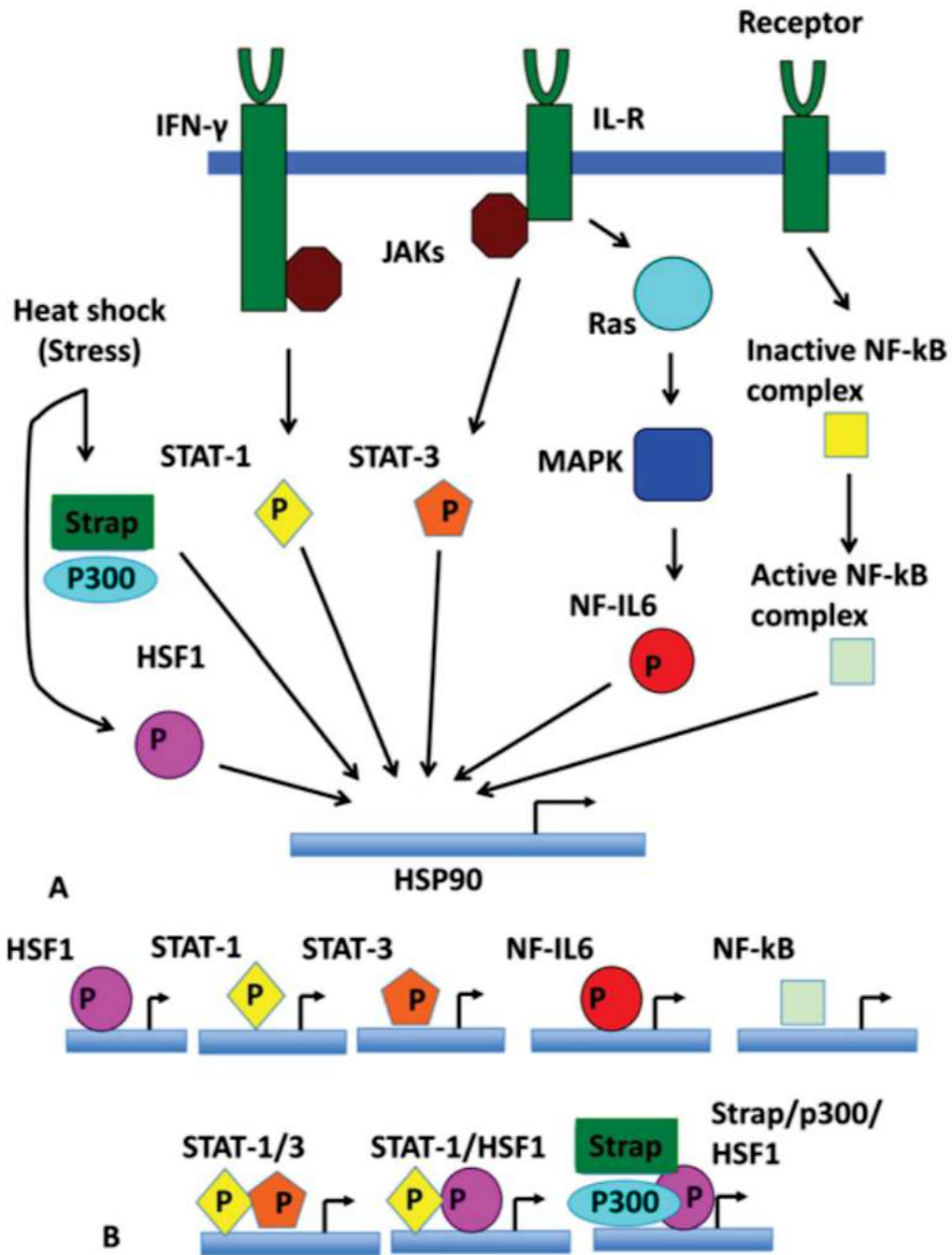


Figure 3 : Intégration des voies de signalisation dans le contrôle de l'expression HSP90

(A) Voies de signalisation connues qui affectent l'expression HSP90. Le co-activateur Daxx n'est pas indiqué dans le schéma, mais est connu pour promouvoir l'activation de HSF1.

(B) Scénario de liaison possible pour les activateurs transcriptionnels et les cofacteurs qui régulent la transcription HSP90. IFN- γ , interféron- γ ; IL-R, récepteur interleukine; JAK, Janus kinase; MAPK, protéine kinase activée par mitogène.

Tiré de Prodromou, 2016

3. Régulation post-traductionnelle de HSP90

HSP90 est impliqué dans divers processus cellulaires, il n'est donc pas surprenant qu'il existe un vaste éventail de modifications post-traductionnelles qui régulent son cycle de chaperon. Bien que la plupart de ces modifications soient communes à HSP90 α et HSP90 β , d'autres sont spécifiques (*Mollapour and Neckers, 2012*). En fonction de l'environnements cellulaires, la réponse à un stress thermique va être différente à cause des modifications post-traductionnelles subies par les protéines HSP90 (*Legagneux, 1991 ; Mollapour, 2010*). La phosphorylation régule non seulement l'activité directe de HSP90, mais aussi sa capacité à interagir avec les chaperons, les nucléotides et les protéines clientes (*Quanz, 2012 ; Zhao, 2001*). Par exemple chez la levure, la phosphorylation de HSP90 au niveau de la thréonine 22 (Thr31 chez l'homme) réduit fortement son interaction avec le co-chaperon Aha1 et affecte son activité chaperon (*Mollapour, 2011*). La phosphorylation de la threonine 725 de HSP90 α détermine l'interaction différentielle avec les co-chaperons HOP (« *HSP70-HSP90 Organizing Protein* ») et CHIP (« *C-terminus of the Hsc (heat-shock cognate) 70-interacting protein* »). Il semble que HSP90 α phosphorylé ne se fixe plus sur CHIP mais interagisse plus avec HOP (*Muller, 2013*). En revanche, d'autres phosphorylations dans HSP90 α et HSP90 β semblent avoir des effets uniquement sur une isoforme. Par exemple, la phosphorylation de la thréonine 90 entraîne la translocation de HSP90 α à la surface cellulaire pour la sécrétion (*Wang, 2009*). Les kinases qui effectuent ces phosphorylations comprennent entre autres les protéines Akt et la CK2 (*Mollapour and Neckers, 2012*).

HSP90 est également sujet à l'acétylation par p300, tandis que la désacétylation se produit par une variété de HDACs. Dans une étude, sept résidus de lysine acétylés ont été identifiés dans HSP90 α : K69, 100, 292, 327, 478, 546 et 558 (*Yang, 2008*). En utilisant de la glutamine pour mimer l'acétylation, tous les mutants ont montré une diminution de liaison pour les nucléotides, sauf K292Q, qui a montré une interaction plus forte. Certains mutants mimant l'acétylation présentaient également une diminution de la liaison avec les co-chaperons et, dans une moindre mesure, avec HSP40. D'autres mutants ont montré une fixation réduite à CHIP, alors que tous les mutants sauf un, ont montré une fixation à HSP70 perturbée. Un des mutants a également montré une diminution de l'association avec les protéines clientes et les récepteurs aux androgènes, et avec certains co-chaperons, y compris Aha1, CHIP et FKBP52 (FK506-binding protein 52). De toute évidence, ces résultats suggèrent que l'acétylation a un impact majeur sur la régulation du HSP90 humain (*Scroggins, 2007*)

Le mécanisme de S-nitrosylation semble affecter HSP90 par un mécanisme allostérique entraînant l'inhibition de son activité ATPase (*Retzlaff, 2009*). Il a été démontré qu'une augmentation de l'ubiquitinylation de HSP90 humain inhibe sa fonction et provoque une dissociation et une dégradation de la protéine cliente par le protéasome (*Murtagh, 2006*). La

phosphorylation du HSP90 humain par Swe1 entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (*Mollapour et al., 2010*). Comme dans le cas de l'ubiquitination du HSP90, le stress oxydatif, qui entraîne l'oxydation directe des résidus de cystéine, entraîne également la dégradation des protéines clientes (*Chen, 2008*). Enfin, la sumoylation asymétrique du domaine N-terminal de HSP90 α semble faciliter l'association d'Aha1 avec HSP90 (*Mollapour, 2014*).

En résumé, une vaste gamme de modifications post-traductionnelles est impliquée dans la régulation du cycle de HSP90, mais pour la plupart, les mécanismes de régulation impliqués dans ces processus sont encore mal compris.

4. Régulation de l'activité ATP de HSP90 par les co-chaperons

La grande variété de clients de HSP90 nécessite un grand nombre de co-chaperons qui vont aider à charger les protéines clientes sur le chaperon et à réguler leur maturation et leur activation. Des analyses cinétiques et des données structurales montrent que l'étape limitant la vitesse du cycle de HSP90 semble être le changement de conformation (*Graf, 2009 ; Hessling, 2009*). Il est cependant suggéré que le mécanisme de fermeture des couvercles du domaine NTD ainsi que l'échange réciproque des brins β et l'association des domaines NTD et MD partagent la même cinétique et que ces changements conformationnels ont lieu en coopération pour aboutir à un état catalytique actif (*Schuler and Hofmann, 2013 ; Schulze, 2016*).

Les cofacteurs de HSP90 sont divisés en co-chaperons précoces et tardifs, selon qu'ils aident à charger ou décharger les clients sur le chaperon. Cela correspond souvent à la façon dont le co-chaperon affecte l'activité ATPasique de HSP90. Les co-chaperons précoces inhibent l'activité ATPasique pour maintenir une structure HSP90 ouverte compatible avec le chargement du client, tandis que le co-chaperon tardif stimule l'activité ATPasique pour favoriser la libération des clients. (*Saibil, 2013*)

i. Aha1

Aha1 n'est pas impliqué dans le chargement des protéines clientes de HSP90. C'est le seul co-chaperon connu qui accélère fortement le cycle ATPase du chaperon (*Meyer, 2004*). Des études structurales ont montré que le domaine N-terminal d'Aha1 peut moduler la boucle catalytique du domaine MD de HSP90 en la stabilisant dans un état actif ouvert. Le passage de la boucle catalytique du domaine MD à son état actif est nécessaire pour la dimérisation coopérative de HSP90, qui favorise son activité ATPase (*Schulze, 2016*). Aha1 favorise la libération des couvercles au début du cycle (*Retzlaff, 2010*) et est nécessaire pour stimuler au maximum l'activité ATPase de HSP90 (*Panaretou, 2002*). En résumé, Aha1 remodèle la boucle catalytique du domaine MD de HSP90 en une conformation favorisant la fixation de l'ATP, en stabilisant les interactions entre le

domaine NTD et MD, et en accélérant la fermeture du couvercle.

ii. Sti1/HOP

Chez les mammifères, le co-chaperon HOP (ou Sti1 chez la levure) est encodé par le gène STIP1. HOP participe à la présentation des protéines clientes à HSP90. C'est une protéine adaptatrice qui forme un complexe ternaire avec HSP70 et HSP90 et stabilise les clients en facilitant leur repliement et leur assemblage. HOP possède trois domaines TPR dont le TPR1 lie la séquence C-terminale (EEVD) de HSP70 et le TPR2A lie la séquence C-terminale (MEEVD) de HSP90 (Scheufler, 2000 ; Schmid, 2012 ; Bhattacharya, 2018). La protéine est absente chez les procaryotes où les orthologues de HSP70 et HSP90 interagissent directement (Genest, 2015 ; Sun, 2019). Plusieurs études dans différents modèles ont montré que HOP n'est pas indispensable en tant que co-chaperon (*S. cerevisiae* : Nicolet and Craig, 1989 ; *C. Elegans* : Song, 2009 ; *D. melanogaster* : Ambegaokar and Jackson, 2011). En revanche chez la souris la délétion de STIP1 est létal très tôt lors du développement embryonnaire (Beraldo, 2013). Bhattacharya et al. ont montré que le complexe HSP70-HOP-HSP90 était nécessaire pour le maintien et l'assemblage des sous-unités 26S et 30S du protéasome (Bhattacharya, 2020). Leurs données montrent que le système HSP70-HSP90 sans HOP est plus dynamique avec une stimulation mutuelle des activités ATPase du partenaire. L'absence de HOP compromettrait seulement l'assemblage de quelques clients de HSP90 essentiels durant le développement embryonnaire précoce.

iii. Cdc37

Cdc37 est également un co-chaperon connu pour participer à la livraison des clients de HSP90 et plus précisément, des kinases clientes. Comme HOP, Cdc37 inhibe aussi l'activité ATPasique de HSP90 (Siligardi, 2002). En début de cycle, Cdc37 va lier HSP90 au niveau du domaine N-terminal, sur les « couvercles » retenant l'ATP (Roe, 2004). En empêchant le mouvement des couvercles, le co-chaperon empêche la dimérisation du domaine. Par la suite, Cdc37 interagit avec le domaine MD de HSP90 (Verba, 2016 ; 2017). C'est Aha1 qui déplace Cdc37 au début du cycle catalytique de HSP90. Il va moduler la boucle catalytique du MD et favoriser le mouvement des couvercles vers un état fermé favorisant la dimérisation N-terminale (Schulze, 2016).

iv. Tah1 et Pih1

Tah1 est un co-chaperon qui, seul, active l'activité ATPasique de HSP90 (Eckert, 2010). Pourtant au sein du complexe Tah1-Pih1, il inhibe l'activité ATPasique du chaperon (Eckert, 2010). Grâce à cette inhibition, la protéine cliente pourrait alors être chargée pour permettre l'assemblage en complexe (Prodromou, 2012).

5. Régulation de l'activité de HSP90 par la modification post-traductionnelle des co-chaperons

La modification post-traductionnelle des co-chaperons ajoute d'autres mécanismes permettant de réguler l'activité HSP90. La phosphorylation des co-chaperons de HSP90 a été peu étudiée, mais son importance est démontrée dans plusieurs publications (*Miyata, 2009 ; Vaughan, 2008*). Pour les kinases, la progression du cycle chaperon nécessite à la fois Cdc37 et Aha1, deux facteurs qui favorisent le processus de chaperon en stimulant l'activité ATPasique de HSP90. La phosphorylation de Cdc37 perturbe son association avec ses clients (*Xu, 2012*). En revanche, la phosphorylation de HSP90 par la kinase Yes (Tyr197) cause la dissociation de Cdc37 de HSP90 (*Xu, 2012*), tandis que la phosphorylation sur Tyr313 favorise le recrutement d'Aha1. La phosphorylation d'Aha1 par la kinase c-Abl semble favoriser son interaction avec HSP90. L'augmentation de la liaison de Aha1 avec HSP90 se traduirait par une activation améliorée de l'activité ATPasique de HSP90 (*Dunn, 2015*).

En conclusion, une variété de co-chaperons sont nécessaires pour fournir les protéines clientes à HSP90 et promouvoir son cycle de chaperon et l'effet régulateur précis de ces co-chaperons dépend à la fois de leur modification post-traductionnelle et de celle du HSP90 lui-même.

C. Rôles de HSP90 dans l'organisme

1. La réponse cellulaire au stress

À la fin des années 90, *Rutherford et Lindquist* ont émis l'hypothèse que HSP90 « tamponnerait les mutations ». Certaines mutations ne s'expriment pas dans un organisme où HSP90 serait actif. Son activité chaperon atténuée ou masque les effets des mutations et entraîne la transmission de ces dernières. Cela aboutit à une plus grande variété génétique, avec une chance que ces mutations apportent un avantage sélectif lors de variations environnementales (*Rutherford and Lindquist, 1998*). Cette étude a été faite chez la drosophile mais cette fonction d'adaptateur évolutif de HSP90 semble conservée chez d'autres espèces comme chez la levure *S. cerevisiae* (*Jarosz and Lindquist, 2010*), ou encore chez la plante *Arabidopsis thaliana* (*Queitsch, 2002*).

Plus récemment, cette hypothèse a été remise en cause. HSP90 contrôle la biogenèse des machineries qui permettent de réprimer la transposition d'éléments génomiques mobiles dans les lignées germinales. L'inhibition de HSP90 provoque des mutations transmissibles à la génération suivante (*Gangaraju, 2011 ; Karam, 2017 ; Specchia, 2010*). Le rôle de HSP90 dans la tolérance phénotypique est donc remis en question. Cependant, le chaperon joue bien un rôle dans l'évolution face au changement d'environnement. En effet, les kinases clientes de HSP90 évoluent plus rapidement que celles qui ne sont pas des clientes de HSP90 (*Lachowiec, 2015*).

2. Rôle de HSP90 dans l'assemblage des protéines

Les protéines HSP90 font partie de larges complexes macromoléculaires contenant différents co-facteurs, d'autres chaperons (HSP70, HSP40) et les protéines clientes. La prise en charge de ces protéines clientes va nécessiter l'intervention successive de HSP40, puis HSP70 et enfin HSP90 (*Frydman and Höhfeld, 1997*). Le schéma suivant a été proposé : HSP40 amènerait la protéine cliente en cours de biogénèse à HSP70. HSP70 procéderait aux premières étapes de repliement, afin que la protéine client acquière une structure secondaire avant de délivrer le client à HSP90 (*Rosenzweig, 2019*). Ce dernier procéderait alors aux dernières étapes de repliement (*Genest, 2019*). HSP90 intervient à un stade tardif de repliement, proche de l'état natif de la protéine cliente. Pour les protéines clientes partiellement repliées, HSP90 va reconnaître à leur surface des résidus hydrophobes et interagir avec afin de permettre à la protéine d'acquies sa structure sans s'agréger. Mais si la protéine cliente n'est pas assez structurée, alors HSP90 va recruter le protéasome qui va la dégrader (*Theodoraki and Caplan, 2012*). Par exemple, pour l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (RG), HSP90 est nécessaire pour que le RG fixe son ligand et soit ainsi actif. Les protéines clientes néo-synthétisées sont d'abord prises en charge par le chaperon HSP40 pour éviter leur agrégation. HSP40 les transfère ensuite à HSP70 qui assure les étapes précoces du repliement. Un complexe se forme alors avec HOP pour transférer le client à HSP90. La liaison à l'ATP se fait durant cette étape, et permet un changement de conformation du dimère de HSP90 de la forme « ouverte » à la forme « fermée ». Ce changement est stimulé par le co-chaperon AHA1. HSP70 et HOP se dissocient du complexe. L'étape suivante est l'hydrolyse de l'ATP. Elle est régulée par d'autres co-chaperons, p23 et PP5.

Le fait que HSP90 interagisse avec un large spectre de protéines clientes vient du fait qu'il s'associe à des cofacteurs protéiques, appelés co-chaperons. Ces dernières régulent son activité et l'aident dans la reconnaissance des substrats. Chaque co-chaperon va spécifiquement adresser un certain type de clients à HSP90 pour que ce dernier joue son rôle de chaperon (*Röhl, 2013*).

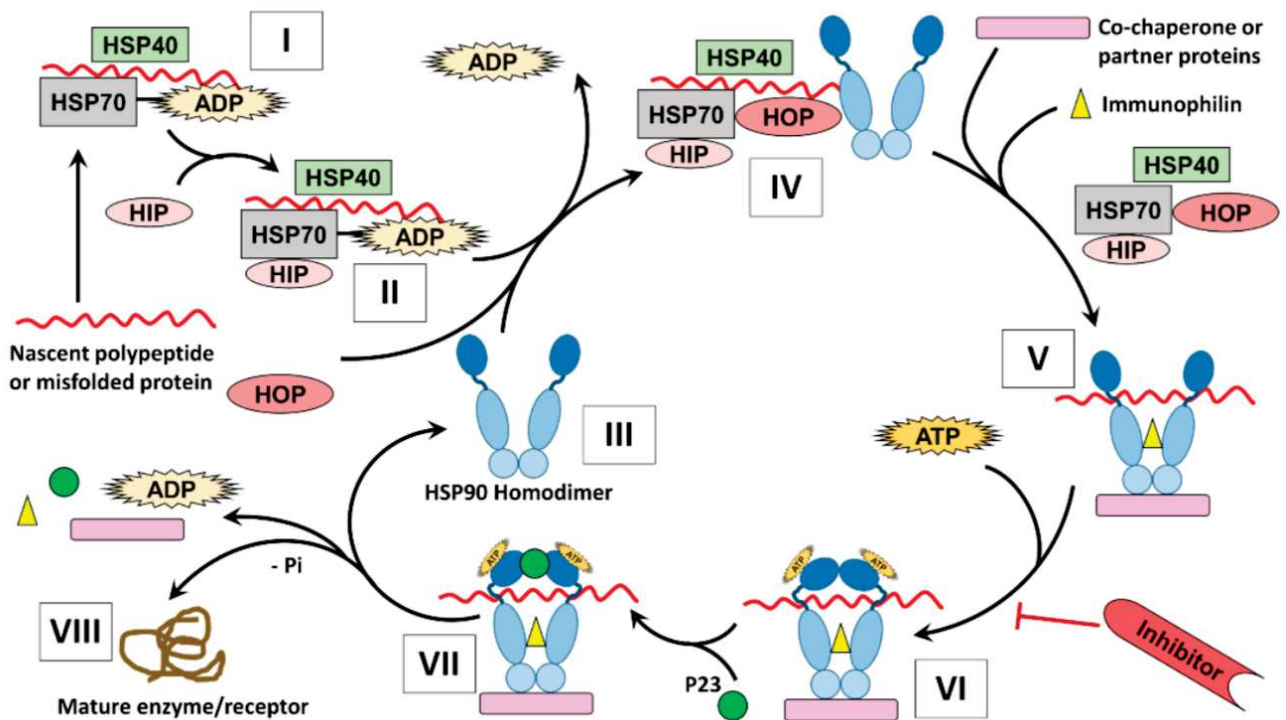


Figure 4 : Mécanisme de repliement des protéines par HSP90.

(I) La protéine cliente mal-formée ou le polypeptide naissant va se lier sur le complexe HSP70/HSP40 lié à l'ADP afin d'être protégée d'une agrégation potentielle (Walter et al., 2002).

(II) Le complexe protéique formé est stabilisé par la Protéine Interagissant avec HSP70 (HIP) ou BAG (Bcl2 Associated Athanogene) qui va induire l'échange d'ADP en ATP (Chaudhury et al., 2006).

(III) HSP90 va se lier à la protéine cliente présentée par le complexe HSP70/HSP40.

(IV) L'interaction entre HSP90 et HSP70 est facilitée par des protéines adaptatrices comme HOP/Sti1 (HSP90-HSP70 organizing protein) (Murphy et al., 2001). A noter que des co-chaperons connus tels que Cdc37 (Cell division cycle 37 homologue), aussi nommé p50, sont nécessaires pour le chargement de la cliente sur HSP90 (Caplan et al., 2005).

(V) Lorsque la cliente est chargée, d'autre co-facteurs, immunophiline-like (FKBP51, FKBP52) s'ajoutent à l'homodimère HSP90 formant ainsi un complexe hétéro-protéique actif avec un relargage de HSP70, HIP et HOP (Kosano et al., 1998).

(VI) La liaison de l'ATP sur le NTD de HSP90 au sein du complexe hétéro-protéique entraîne un changement de conformation d'un "état ouvert" à un "état fermé" (Prodromou et al., 2000). Plusieurs inhibiteurs de HSP90 agissent à ce stade là en entrant en compétition avec l'ATP pour la liaison sur le NTD entraînant la dégradation des protéines clientes par le protéasome (Donnelly et al., 2008).

(VII) Si aucun inhibiteur n'interfère avec le cycle, d'autres co-facteurs viennent s'associer comme p23 et Aha1 (Activator of HSP90 ATPase Homologue 1).

(VIII) La liaison de Aha1 (absente du schéma) sur le MD de HSP90 induit l'hydrolyse de l'ATP et aide au repliement de la cliente ainsi qu'au relargage des immunophilins et des co-facteurs (Ali et al., 2006).

Tiré de Hoter et al., 2018

II. Le PAQosome, co-chaperon de HSP90

A. Découverte du R2TP/PAQosome

En 2005, Zhao *et al.*, ont identifié chez la levure *S. Cerevisiae* les protéines interagissant avec HSP90 par plusieurs méthodes dont un crible double hybride, un test de létalité synthétique ainsi qu'une analyse protéomique à haute résolution (Zhao, 2005). Parmi les partenaires de HSP90, ont été trouvés les co-chaperons Tah1p (« *TPR repeat-containing protein Associated with HSP90* ») qui interagit directement avec HSP90 et Pih1p (« *Protein interacting with HSP90* ») et il a été montré que ces deux co-facteurs interagissent également avec les AAA+ (« *ATPases Associated with various cellular Activities* ») ATPases Rvb1p et Rvb2p. Ces quatre protéines, Rvb1p, Rvb2p, Tah1p et Pih1p, forment chez la levure un complexe nommé R2TP pour les initiales de chaque sous-unité, qui en association avec le chaperon HSP90, forme le complexe HSP90/R2TP. Rvb1p et Rvb2p s'assemblent en un anneau hétéro-hexamérique ou dodécamérique (Cheung, 2010) et l'hétéro-dimère Pih1p-Tah1p interagit avec cet anneau. C'est le premier co-chaperon multimérique décrit pour HSP90.

En 2007, le groupe de Coulombe a identifié un réseau de nouvelles protéines associées avec l'ARN polymérase II chez l'homme cette fois (Jeronimo, 2007). Ce réseau de protéines comprenait RUVBL1 et RUVBL2, les homologues de Rvb1p et Rvb2p. Les auteurs ont également identifié une protéine non caractérisée auparavant contenant des motifs de répétition de tétratricopeptides (TPR) en hélice-tour-hélice, qu'ils ont nommé RPAP3 en raison de son association physique avec l'ARN Pol II (« *RNAPII associated protein 3* »).

En 2008, notre équipe met en évidence, grâce à des bases de données sur les interactions systématiques, qu'une protéine TPR de *Drosophila melanogaster* appelée Spaghetti (FLJ21908) interagissait avec dHSP90 et dPih1p dans des cribles double-hybride (Giot, 2003). De plus, l'homologue humain de Spaghetti a été trouvé dans le protéome HSP90 (Te, 2007), ce qui suggère qu'il pourrait représenter l'homologue fonctionnel de la levure Tah1p. Pour tester cette possibilité, le laboratoire a généré un anticorps contre RPAP3 et effectué des co-immunoprécipitations. RUVBL1, RUVBL2 et PIH1D1 ont été immunoprécipités avec cet anticorps montrant qu'il existe un complexe chez l'homme homologue à celui de la levure (Boulon, 2008).

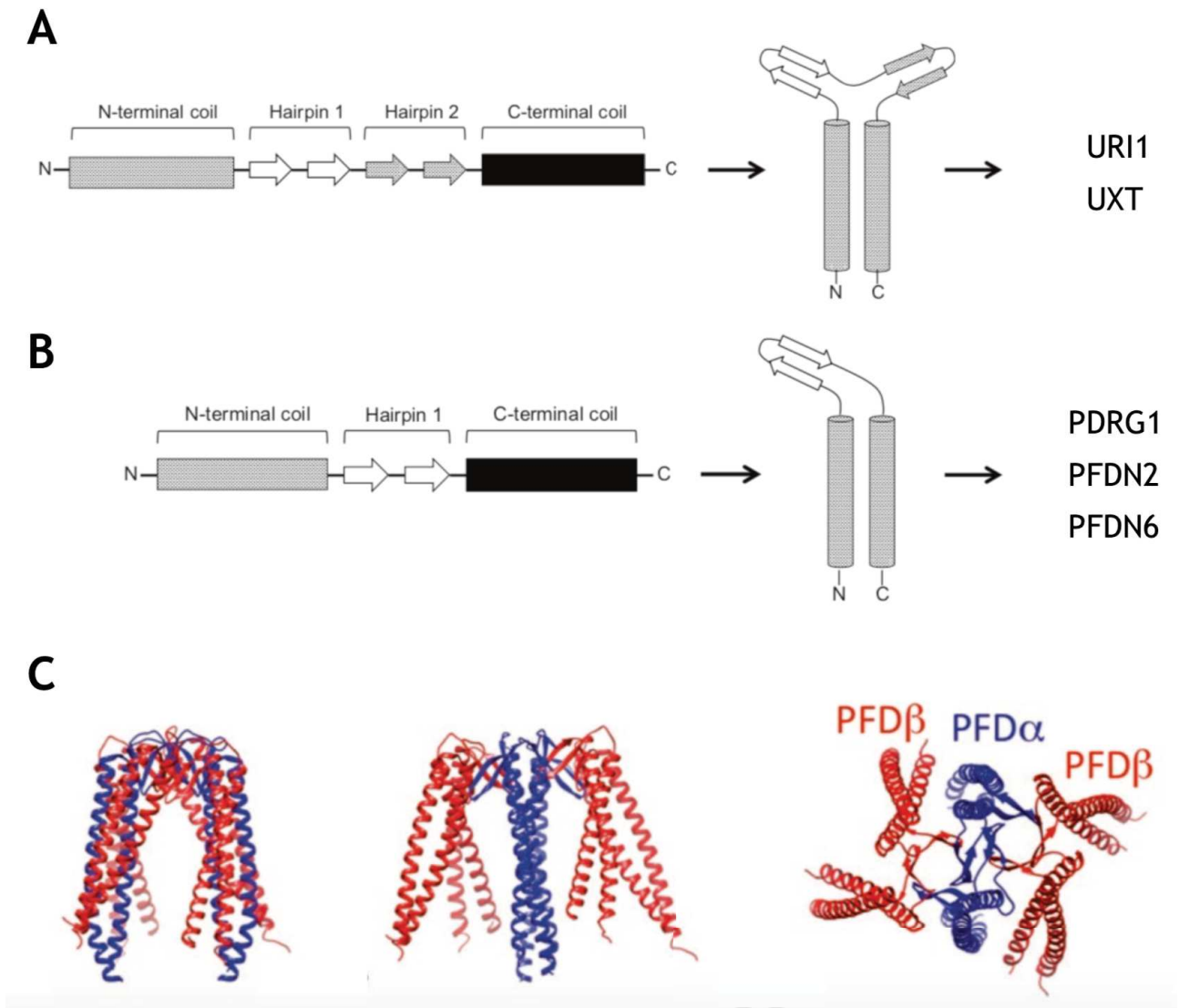


Figure 5 : Composition du complexe préfoldine (PFD)

(A et B) Comparaison structurale des sous-unités PFD α et PFD β . Les composantes de structure secondaire de PFD α (A) et de PFD β (B) sont représentées sous forme de schéma où les rectangles et les flèches correspondent respectivement aux hélices alpha et aux brins β . PFD α a quatre brins β qui se replient en deux structures d'épingle à cheveux séparées alors que PFD β a seulement deux brins β qui forment une épingle à cheveux unique.

(C) Structure de l'hétérohexamère d'archée de PFD. Trois vues orthogonales des structures issues de cristallographie chez *M. thermoautotrophicum* (Siegert, 2000). Deux PFD α occupent la position centrale et sont responsables du maintien de la structure oligomérique. Quatre copies de PFD β entourent les sous-unités PFD α .

Adapté à partir de Lim, 2018 et Arranz, 2018

En 1998, le groupe de Cowan a fait la découverte des protéines chaperons hétéro-hexamériques, appelés les préfoldines (PFD), et a caractérisé leur capacité à lier les protéines dépliées et à les diriger vers des voies de repliement (*Vainberg, 1998*). Les préfoldines accompagnent les protéines naissantes ou mal repliées vers les chaperons pour favoriser leur repliement. Deux ans plus tard, Siegert *et al.* décrivaient la structure très conservée du complexe hétéro-hexamérique préfoldine, une structure semblable à une méduse composée d'un tonneau β à partir duquel ressort six longues hélices α (**Figure 5C**) nécessaires à la fixation de protéines non-natives (*Siegert, 2000*). Il existe deux classes de sous-unités préfoldines, α et β , qui comportent toutes deux des hélices α aux bornes N et C reliées par une épingle à cheveux β (PFD de classe β ; **Figure 5B**) ou bien deux (PDF de classe α ; **Figure 5A**) (*Siegert, 2000* ; *Gstaiger, 2003*). Chez les eucaryotes, deux sous-unités α s'associent de manière indépendante avec quatre sous-unités β pour former un complexe préfoldine $\alpha_2\beta_4$.

En 2003, le laboratoire de Wilhelm Krek a identifié un membre atypique de la famille des préfoldines, appelé URI, formant un nouveau complexe de chaperons de type Prefoldin-Like (PFDL) (*Gstaiger, 2003*). Le complexe PFDL observé chez l'homme et la drosophile (*Cloutier, 2009* ; *Giot, 2003*) est composé des sous-unités α URI1 et UXT et des sous-unités β PDRG1, PFDN2 et PFDN6. Le complexe PFDL peut être pentamérique ou hexamérique avec l'une des sous-unités β dupliquée. Chez la levure, on ne retrouve que Bud27, Gim4 et Gim1 (homologues de URI1, PFDN2 et PFDN6 respectivement). Outre URI1, qui participe à la signalisation mTOR (*Gstaiger, 2003*), les autres sous-unités du complexe agissent principalement dans le noyau en tant que régulateurs transcriptionnels (*Lynham and Houry, 2018*).

En réalisant des purifications par affinité des protéines RUVBL ou de RPAP3 étiquetée, Coulombe et son équipe ont identifié le complexe R2TP/Prefoldin-like. Ce dernier est composé du R2TP complet (RUVBL1, RUVBL2, RPAP3 et PIH1D1), du complexe Prefoldine-Like PFDL (PFDN2, PFDN6, PDRG1, UXT, URI1) ainsi que de ses protéines associées (RPB5/POLR2E et WDR92/Monad) (*Jeronimo, 2007* ; *Cloutier, 2009*). RPB5, aussi appelée POLR2E, est une protéine présente dans les trois ARN polymérases (*Pati and Weissman, 1989* ; *Zaros, 2007*). Elle peut participer à l'assemblage des ARN polymérases en fournissant une grande interface d'interaction à la plupart des autres sous-unités (*Acker, 1997*). De plus, RPB5 interagit avec plusieurs facteurs de transcription et régulateurs de gènes comme URI1 (*Dorjsuren, 1998*), TFIIB (*Lin, 1997*), TFIIF (*Le, 2005*), RSC4 (*Soutourina, 2006*), POLR2M (*Jishage, 2012*) et la protéine X du virus de l'hépatite B (*Cheong, 1995*).

WDR92 est une protéine qui contient sept motifs WD40 (*Saeki, 2006* ; *Xu, 2011*). La répétition WD40 est une structure tertiaire caractérisée par l'arrangement de quatre à huit feuillets β en forme

de lame autour d'un axe central selon une configuration toroïdale, une caractéristique déterminante de tous les motifs WD40 (Neer, 1994 ; Xu, 2011). Il a été démontré que WDR92 interagissait avec PIH1D1 dans les cellules de mammifères (Inoue, 2010). En outre, il est également proposé qu'il interagisse avec RPAP3 (Itsuki, 2008). Étant donné que WDR92 est absent dans la levure *S. cerevisiae* et que RPAP3 est environ six fois plus grand que Tah1p, WDR92 peut avoir évolué pour servir d'échafaudage pour les interactions protéine-protéine, une fonction commune pour les protéines de répétition WD40.

Une revue écrite en 2018 par Houry W. A., Bertrand E. et Coulombe B. décrit l'existence de ce co-chaperon de HSP90. Les auteurs ont proposé de renommer ce complexe R2TP/PFDL en PAQosome pour « *Particle for Arrangement of Quaternary structure* » (Houry, 2018) du fait de sa fonction de co-chaperon impliqué dans la formation de la structure quaternaire à partir des protéines nouvellement repliées par les HSP (**Tableau 1**).

Table 4.2 Summary of PAQosome subunit functions

Subcomplex	Subunit	Yeast ortholog	Function within the PAQosome	Functions outside the PAQosome
R2TP complex	RuvBL1/2	Rvb1/2	Client complex assembly and dissociation	Transcriptional regulation, DNA repair, mitotic spindle assembly
	PIH1D1	Pih1	Scaffold for adaptors and clients	Stress induced signaling, may be involved in exosome signaling
	RPAP3	Tah1	Flexible tether for Hsp90; stabilizes PIH1D1	Transcriptional regulation, DNA damage response, stem cell maintenance, circadian rhythm regulation
URI1 Prefoldin complex	URI1	Bud27	May regulate R2TP complex activity and localization; stabilizes RPB5	Nutrition signaling, transcriptional regulation
	UXT		May stabilize URI1 prefoldin complex	Male germ cell differentiation, transcriptional regulation
	PDRG1			Methionine adenosyl transferase regulation
	PFDN2	Gim4		Component of canonical prefoldin complex, transcriptional regulation within nervous system
	PFDN6	Gim1		Component of canonical prefoldin complex, adaptive immunity and cancer
None	WDR92		May stabilize RPAP3-PIH1D1 interaction	Dynein arm assembly within R2TP-like complexes
	RPB5	Rpb5	Scaffold for RNAP II	Component of all three RNAPs

Tableau 1 : Résumé des fonctions des sous-unités du PAQosome

Tiré de Lynham and Houry, 2018

B. Structure et mécanismes d'action du PAQosome

Le complexe R2TP/PFLD est finalement aujourd'hui le mieux décrit des co-chaperons multimériques de HSP90 (Vaughan, 2014 ; Boulon, 2010). Tous les composants du R2TP ne sont pas essentiels à la survie de la cellule. Chez la levure *S. cerevisiae*, il a d'abord été montré que Rvb1p et Rvb2p sont essentielles (Qiu, 1998). Les protéines RUVBL sont conservées dans tous les eucaryotes et sont également essentielles chez les mammifères (Qiu, 1998). Elles portent la fonction catalytique du R2TP et elles existent également dans d'autres complexes que le R2TP tels que TIP60 (Ikura, 2000), SWR-C (Mizuguchi, 2004), SRCAP (Cai, 2005) et INO80 (Shen, 2000 ; von Morgen, 2015). RPAP3 et PIH1D1 fonctionnent quant à eux comme des adaptateurs pour recruter les clients et font le pont entre HSP90 et les RUVBL.

Martino *et al.*, ont montré qu'en absence de RPAP3-PIH1D1, RUVBL1 et RUVBL2 formaient un double anneau dodécamérique (Martino, 2018). Chez l'homme, les deux hexamères de RUVBL sont en conformation dodécamérique via l'interaction de leurs domaines DII (Martino, 2018). Pih1p et Tah1p ne sont pas essentiels chez *S. cerevisiae* et leurs homologues sont absents chez certaines levures, plantes et champignons (Houry, 2018). Cependant, chez la drosophile et la souris, RPAP3 est un gène essentiel (Benbahouche, 2014 ; Maurizy, 2018).

La fixation du complexe RPAP3-PIH1D1 sur les RUVBL diffère entre l'homme et la levure. Chez la levure *S. cerevisiae*, le domaine flexible DII de l'hétéro-hexamère Rvb1p/Rvb2p forme un panier accueillant un complexe Tah1p-Pih1p (Rivera-Calzada, 2017 ; Tian, 2017) (**Figure 6E**). En termes de stœchiométrie, le R2TP comprend trois Rvb1p et trois Rvb2p pour un Tah1p et un Pih1p. Pih1p va servir de plateforme d'ancrage des différents membres du complexe R2TP. Son domaine CS va lier les derniers résidus non structurés en C-terminal de Tah1p. La région de Pih1p entre les domaines PIH et CS n'est pas structurée mais est nécessaire pour l'association avec les Rvb (Rivera-Calzada, 2017). En se fixant au domaine DII, le complexe Tah1p-Pih1p va stimuler l'activité ATPasique des Rvb1p et Rvb2p. Cette interaction induit des réarrangements conformationnels entraînant la déstabilisation d'un segment N-terminal de RUVBL2. Le segment empêche l'échange de nucléotide et sa déstabilisation ouvre l'accès au site de liaison à l'ATP de RUVBL1-RUVBL2 (Muñoz-Hernández, 2019).

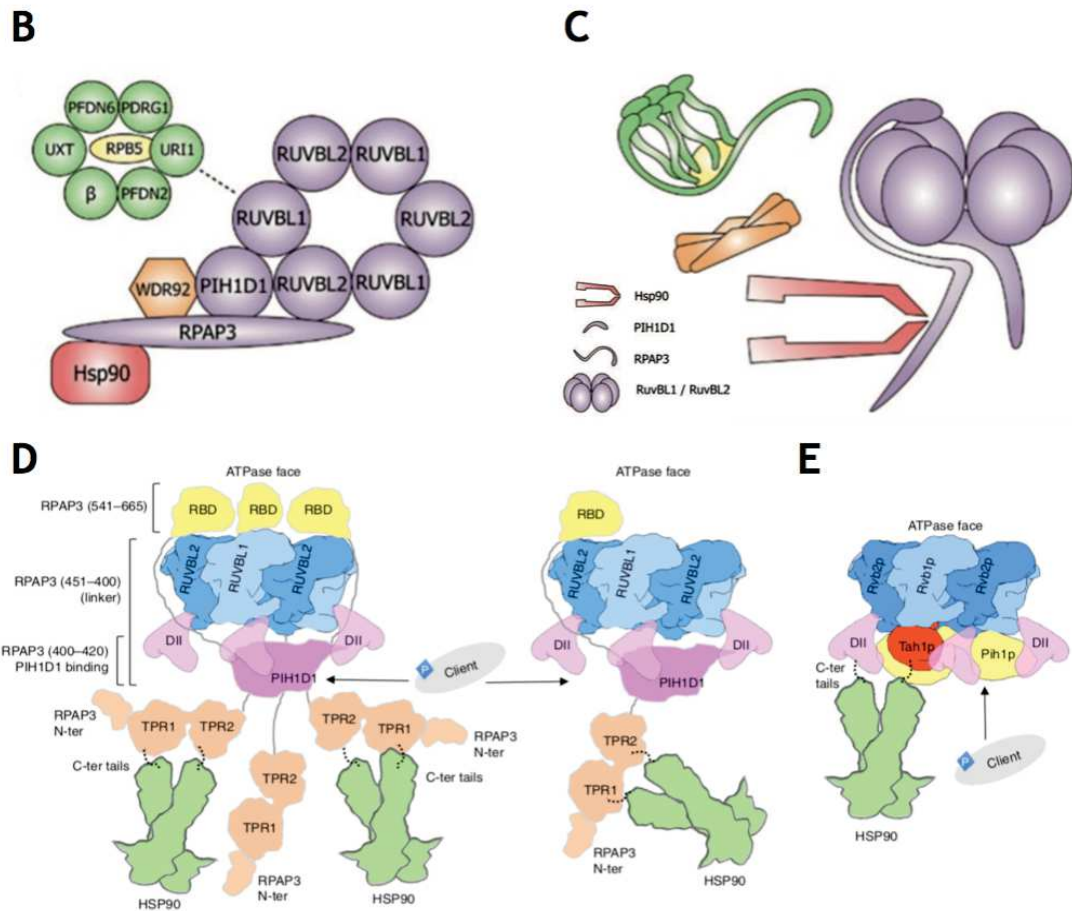
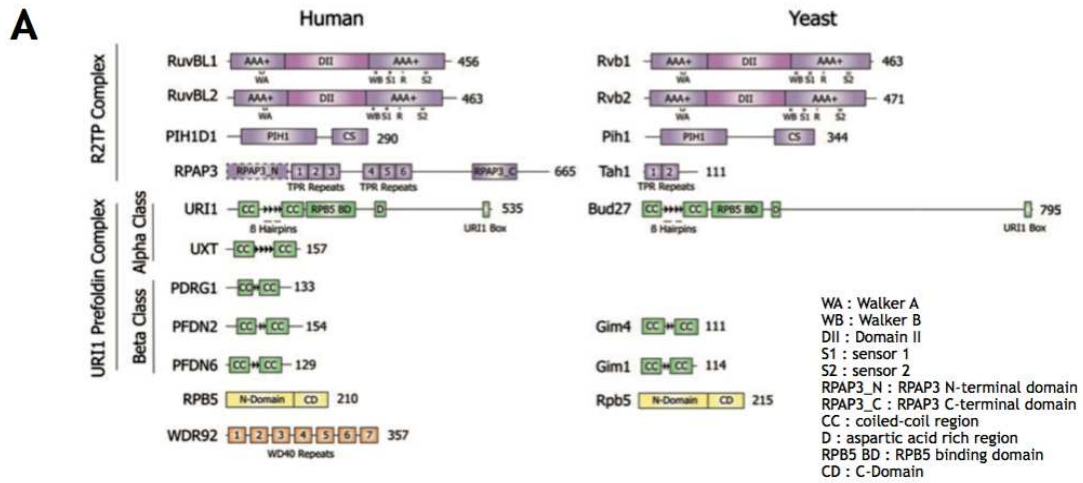


Figure 6 : Composants du PAQosome humain et leur homologue chez la levure *S. cerevisiae*

(A) Domaine des sous-unités du PAQosome.

(B) Schéma de l'organisation des différentes sous-unités du PAQosome entre elles, avec le complexe R2TP (violet), le complexe PFDL (vert), RPB5 (jaune), WDR92 (orange) et HSP90 (rouge).

(C) Schéma de la structure du PAQosome.

(D) Schéma de la structure du R2TP humain. Jusqu'à trois RBDs servent à ancrer trois RPAP3 sur RUVBL1–RUVBL2, alors qu'un segment central de RPAP3 aide à recruter PIH1D1. Le nombre de molécules RPAP3 par anneau RUVBL *in vivo* n'est pas connu, et deux options sont présentées dans la figure.

(E) Schéma de la structure du R2TP levure. Un seul HSP90 lie chaque R2TP.

Adaptée de Lynham and Houry, 2018 et Martino, 2018

Chez l'homme, c'est RPAP3 qui va recruter les différents composants du R2TP. La protéine PIH1D1 n'est pas stable lorsqu'elle est exprimée seule (Martino, 2018). Vingt résidus de RPAP3 (situés entre les domaines TPR2 et C-terminal) et le domaine CS de PIH1D1 sont tous les deux nécessaires et suffisants pour stabiliser PIH1D1 et former le complexe RPAP3-PIH1D1 (Pal, 2014 ; Henri, 2018). Ce complexe va venir se fixer sur l'hétéro-hexamère RUVBL1/RUVBL2 (**Figure 6D**). La protéine RPAP3 est six fois plus grande que son homologue Tah1p chez la levure (voir section suivante) ce qui lui permet de lier les RUVBL en différents endroits. Martino *et al.* et dans le même temps notre laboratoire, ont montré que le domaine RBD (« *RUVBL2 Binding Domain* ») en C-terminal de RPAP3 interagissait avec le domaine ATPase de RUVBL2 (Martino, 2018). Notre laboratoire a montré que certains substrats comme NOP58 dépendent de cette interaction pour être associé au R2TP (Maurizy, 2018). L'étude par cryo-EM a montré que RPAP3 CTER est sur une face de l'anneau RUVBL1/2 et que le reste des domaines de RPAP3 se localisaient sur l'autre face de l'anneau avec PIH1D1 (Martino, 2018 ; Maurizy, 2018) (**Figure 6 C et D**). Ils évoquent également la possibilité que plusieurs protéines RPAP3 (jusqu'à trois), pour une protéine PIH1D1, pourraient être recrutées par anneau de RUVBL mais qu'un seul RPAP3 serait engagé dans la liaison avec PIH1D1.

Chez la levure *S. cerevisiae*, comme chez l'homme, HSP90 va venir se fixer sur le R2TP via les domaines TPR de Tah1p et RPAP3 (Millson, 2008)(**Figure 6 B, C**). Alors qu'il est maintenant clair que le PAQosome est responsable de l'assemblage de plusieurs grands complexes protéiques, le mécanisme exact par lequel il le fait demeure encore incompris. Suivant le complexe assemblé et l'espèce étudiée, les substrats vont pouvoir interagir avec une sous-unité du R2TP en particulier mais des interactions ont été décrites pour toutes les sous-unités du R2TP. Cela peut se faire via des adaptateurs qui se lient à PIH1D1 (Tel2, ECD), RUVBL1 (ECD, C12ORF45/NOPCHAP1), RUVBL2 (ZNHIT2, ZNHIT3, ZNHIT6) et peuvent ensuite être assemblés et stabilisés par la plateforme formée par R2TP/PFDL avec HSP90 (Mita, 2013 ; Houry, 2018 ; Cloutier, 2017 ; von Morgen, 2015). Muñoz-Hernández *et al.*, ont récemment montré que la liaison de PIH1D1 sur RUVBL1/2 provoque un changement de conformation du domaine DII de RUVBL2 et entraîne un remodelage du site de liaison à l'ATP le rendant ouvert et plus accessible. Ils identifient PIH1D1 comme un facteur d'échange nucléotidique régulant l'activité ATPase des RUVBL au sein du complexe R2TP. Ce modèle de régulation de l'activité de RUVBL1 et RUVBL2 pourrait être similaire dans les autres complexes où on les retrouve (Muñoz-Hernández, 2019). Un modèle émergent suggère qu'un seul des composants du R2TP ciblerait une sous-unité des complexes multi-protéiques. L'interaction des différents composants se ferait ensuite soit passivement en rapprochant les différents composants les uns des autres, soit activement en effectuant un

réarrangement mécanique piloté par l'hydrolyse de l'ATP des RUVBL ou des HSP (*Gauthier, 2018*).

Récemment, des PAQosomes-like ont également été caractérisés (*Maurizy, 2018*) dans lesquels RPAP3 et PIH1D1 sont remplacées par des protéines homologues qui fournissent la base pour l'assemblage d'autres complexes protéiques clients dont certains sont tissus spécifiques. Il est donc possible que les PAQosomes-like puissent chacun assembler leurs complexes protéiques spécifiques et ainsi augmenter le nombre de complexes et réseaux potentiels régulés par ce système chaperon/co-chaperon (*Coulombe, 2018*).

C. Sous-unités du R2TP

1. PIH1D1 (Pih1p, Nop17)

La protéine nucléolaire Nop17 a été identifiée chez la levure *S. cerevisiae* lors de la recherche de partenaires de Rrp43, un composant de l'exosome (*Gonzales, 2005*). Le gène NOP17 n'est pas essentiel pour la viabilité des cellules mais sa délétion confère un défaut de croissance aux levures avec un phénotype accentué à 37°C. Les auteurs ont observé une diminution du nombre de polysomes et de ribosomes avec la formation des ARNr partiellement affectée dans la souche Δ nop17. Dans cette souche, le pré-ARNr subit des processus de maturation ou de dégradation non observés dans la souche parentale. De plus, la déplétion de Nop17 conduit à une délocalisation des protéines coeur des snoRNP (Nop1, Nop56, Nop58 et Snu13). Pourtant, en absence de Nop17, Nop58 a été trouvé plus fortement associé aux snoRNA à boîtes C/D (*Gonzales, 2005*). Plus tard, le même laboratoire a montré que Nop17 est un interactant direct de NOP58 qui intervient pour stabiliser NOP58 dans la particule snoRNP en cours d'assemblage (*Prieto, 2015*). On savait alors que Nop17 correspondait à Pih1p et il a été montré qu'il interagit aussi avec les autres composants du R2TP (*Kakihara and Houry, 2012*).

Les protéines Pih1p de levure et PIH1D1 humaine partagent plusieurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. Elles sont constituées de deux domaines : un domaine PIH1 en N-terminal et un domaine CS en C-terminal (**Figure 7 A**). Chez *S. cerevisiae*, Pih1p est instable seul et se stabilise en interaction avec le domaine C-terminal de Tah1p (*Eckert, 2010*). Dans les cellules de mammifères, PIH1D1 est également stabilisé par la liaison avec RPAP3 (*Yoshida, 2013*) (voir détails dans le paragraphe **2. RPAP3**). Chez la levure *S. cerevisiae*, la région reliant les domaines PIH et CS ne contient aucune caractéristique structurale reconnaissable, mais est nécessaire pour

coupler Pih1p à Rvb1p-Rvb2p (*Paci, 2012*). Pih1p sert de plateforme d'assemblage du R2TP de levure en reliant Rvb1p-Rvb2p à Tah1p, qui à son tour couple le complexe R2TP à HSP90 (*Rivera-Calzada, 2017 ; Tian, 2017*). Son homologue PIH1D1 est avant tout une protéine d'échafaudage qui intervient dans la médiation des interactions du PAQosome avec ses complexes clients. Le domaine C-terminal de PIH1D1/Pih1p contient un domaine CS qui apparaît également dans les co-chaperons de HSP90 comme p23 ou Sgt1 (*Ali, 2006*), et qui interagit directement avec HSP90 (*Quinternet, 2015*). Ce domaine CS interagit avec RPAP3/Tah1p (*Pal, 2014 ; Morgan, 2015*). Il est constitué d'un sandwich β à sept brins avec la topologie d'un domaine CS (*Pal, 2014*). Tous les résidus hydrophobes des différents brins sont protégés soit par les dix derniers résidus de Tah1p chez la levure, soit par des résidus situés après les TPR de RPAP3 chez l'homme (**Figure 8 A**). L'interaction de ces deux protéines sera développée dans le paragraphe suivant après la présentation de la protéine RPAP3/Tah1p.

Le domaine PIH se compose d'un feuillet β à cinq brins β avec une face traversée par un segment hélice-tour-hélice reliant les brins 4 et 5, et l'autre face traversée par un segment « *coil* » s'étendant à partir de l'extrémité du brin 5. Une hélice supplémentaire reliant les brins 2 et 3 se projette à partir de l'extrémité du feuillet et se colle contre la plus grande des deux autres hélices (**Figure 7B** ; *Pal, 2014*). TEL2 est une protéine essentielle à la stabilité du complexe mTOR et SMG1 (*Kamano, 2013*) et comporte quatre résidus très conservés DSDD/E, dont la sérine est phosphorylée (pS) par la kinase CK2 (voir partie **Assemblage des PIKK**). La poche du domaine PIH se lie à plusieurs clients et facteurs d'assemblage à travers le motif DSDD/E sans que la phosphorylation du substrat soit nécessaire (*Hořejší, 2014 ; von Morgen, 2017*). Parmi les protéines reconnues par la poche on retrouve ECD, UBR5, PTGES3, EIF5B, TRP12, SFRS18 et RPB1 (*Hořejší, 2014*) ou encore MRE11 (*von Morgen, 2015*). La reconnaissance des protéines phosphorylées se fait par l'intermédiaire des lysine K57 et K64 du domaine PIH (**Figure 7C** ; *Hořejší, 2014*). Ces deux lysines sont conservées dans l'évolution et leur mutation abolit l'interaction avec la protéine TEL2 (*Pal, 2014*).

Dans les cellules eucaryotes, d'autres protéines possèdent ce domaine PIH liant les substrats via leur poche PIH (**Figure 7D**). C'est le cas de DNAAF2 (aussi appelé Kitoun) un orthologue de PIH1D1 impliqué dans l'assemblage cytoplasmique des dynéines et requis pour la motilité des cils (*Omran, 2008*). Les lysines à charge positive importantes pour la liaison avec les substrats sont remplacées par des arginine à charge positive dans DNAAF2 et cette dernière est capable de lier le peptide Tel2 phosphorylé avec une faible affinité (*Hořejší, 2014 ; Pal, 2014*). On observe ces protéines à domaine PIH en association avec des protéines possédant des domaines TPR et formant

des complexes R2TP-like présents dans des types cellulaires particuliers ou nécessaires à des fonctions cellulaires précises (*Maurizy, 2018*).

PIH1D1 peut avoir des rôles supplémentaires dont on ne sait pas encore s'ils sont dépendants ou non du PAQosome. Comme dit précédemment, la délétion de Pih1p entraîne un phénotype sensible à la température chez la levure (*Gonzales, 2005*). Une délétion de PIH1D1 par siARN dans des cellules U2OS rend ces dernières sensibles à l'apoptose induite par la doxorubicine, ce qui suggère un rôle pour moduler les voies induites par le stress (*Inoue, 2010*). De plus, PIH1D1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la synthèse et le traitement de l'ARNr. En effet, Pih1p a été identifié dans la levure comme un interactant de la sous-unité exosome Rrp43 qui participe au traitement de l'ARNr (*Gonzales, 2005*). PIH1D1 s'associe également à l'histone H4 pour favoriser la transcription de l'ARNr par le recrutement de l'ARN Pol I (*Kamano, 2013*). PIH1D1 peut également contribuer à la régulation de la dégradation protéasomale de certaines protéines, car il a été démontré que son interaction avec le SNF5, un composant du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, atténue la dégradation de SNF5 (*Lynham and Houry, 2018*).

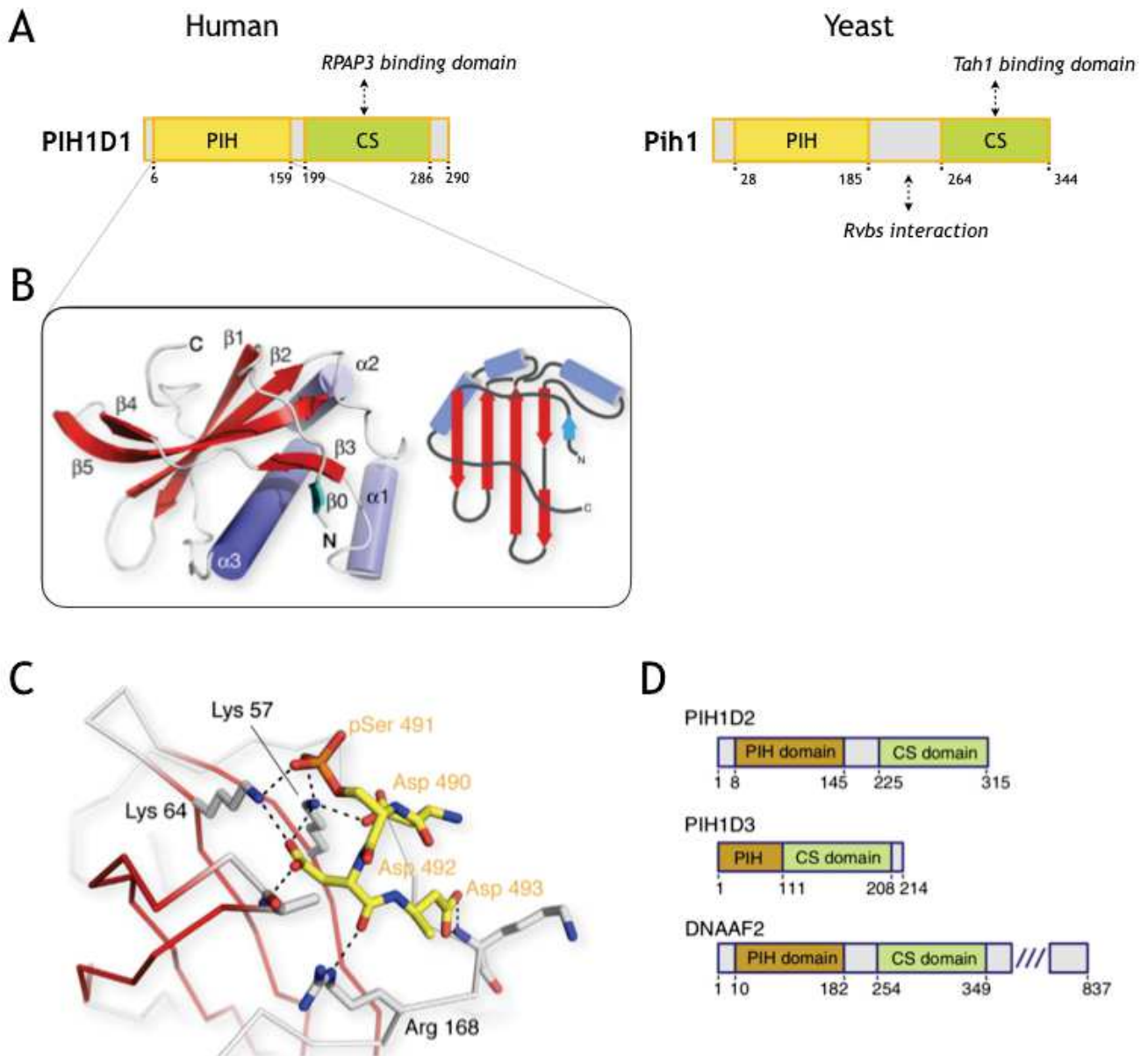


Figure 7 : Structure de domaine PIH-N et interactions Tel2

(A) Architecture de PIH1D1 humain et de levure *S. cerevisiae*

(B) Gauche, représentation des domaines PIH1D1 PIH-N hors complexe R2TP. Droite, représentation schématique de la topologie $\alpha + \beta$ globale. β_0 (cyan) contient quatre résidus non natifs provenant de la séquence du vecteur d'expression qui imitent très probablement la conformation de la séquence native qui a été enlevée lors de la construction du fragment cristallisable.

(C) Le motif DpSDD de TEL2 est sécurisé par un réseau d'interactions dsaline et de liaison d'hydrogène avec trois résidus PIH1D1_NTER : Lys57, Lys64 et Arg168.

(D) Architecture des autres protéines humaines contenant un domaine PIH (PIH) avec les domaines « CHORD-containing and SGT1 domain » (CS) également indiqués.

Tiré de Hořejší, 2014 et Maurizy, 2018

2. RPAP3 (Tah1p, Spag1)

La protéine Tah1p a été identifiée comme l'un des partenaires de la protéine Hsp82 (Zhao, 2005). Son homologue humaine correspond à la protéine RPAP3 qui avait été isolée lors d'un crible d'interaction avec l'ARN polymérase II (Jeronimo, 2007). Cependant, ces deux protéines sont de tailles très différentes bien qu'elles possèdent un domaine commun (665 acides aminés pour RPAP3 contre 111 pour Tah1p) (**Figure 8 A**). De plus, la délétion de Tah1p chez *S. Cerevisiae* n'entraîne pas de défaut de croissance, tandis que chez la drosophile et la souris, RPAP3 est un gène essentiel pour le développement de l'organisme (Benbahouche, 2014). La délétion de SPAG1 (homologue de RPAP3 chez la drosophile) est létale au stade larvaire mais n'entraîne pas de changement dans l'homéostasie des tissus au stade adulte (Chen, 2018) bien qu'elle ait des fonctions essentielles dans divers processus biologiques tels que la régulation du rythme circadien (Means, 2015) et l'assemblage de machineries cellulaires (Benbahouche, 2014). Chez la souris, RPAP3 est essentiel au développement embryonnaire. RPAP3 est également requis pour le renouvellement de l'épithélium intestinal (Maurizy, en révision chez *Nat Commun*). Les auteurs ont montré que la sur-expression de RPAP3 était corrélée avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer colorectal. Ceci suggère que les protéines RPAP3 et Tah1p ont des modes d'action différents suivant les espèces impliquant des domaines supplémentaires chez les eucaryotes supérieurs.

La protéine de levure, Tah1p

La partie N-terminale de Tah1p possède un court domaine TPR qui reconnaît spécifiquement le motif MEEVD de Hsp82. Le domaine TPR est constitué de motifs TPR correspondant à une succession d'hélices α disposées dans une topologie de répétition d'hélices α droites anti-parallèles (**Figure 8 C**). Ces domaines TPR sont des domaines d'interaction protéine-protéine et sont retrouvés au sein des protéines qui modulent l'activité de la protéine Hsp82 (Pal, 2014). Contrairement aux autres domaines TPR, Tah1p n'a que cinq hélices plutôt que les sept caractéristiques des structures TPR liant HSP90 (Morgan, 2012). Mais malgré cette différence, Tah1p interagit tout de même avec les motifs MEEVD de Hsp82 (**Figure 8 C**). Tah1p possède également un domaine C-terminal non structuré qui se lie à Pih1p (Quinternet, 2015). Les 20 résidus après la cinquième hélice α du domaine TPR en C-terminal de Tah1p n'ont pas de structure (Back, 2013), mais constituent la majeure partie de l'interaction avec Pih1p (Pal, 2014). In vivo, Tah1p stabilise Pih1p et initie la formation du complexe R2TP (Zhao, 2008). Tah1p, seul et en complexe avec Pih1p, relie Hsp82 à un rapport stoechiométrique de 2:2 (Eckert, 2010).

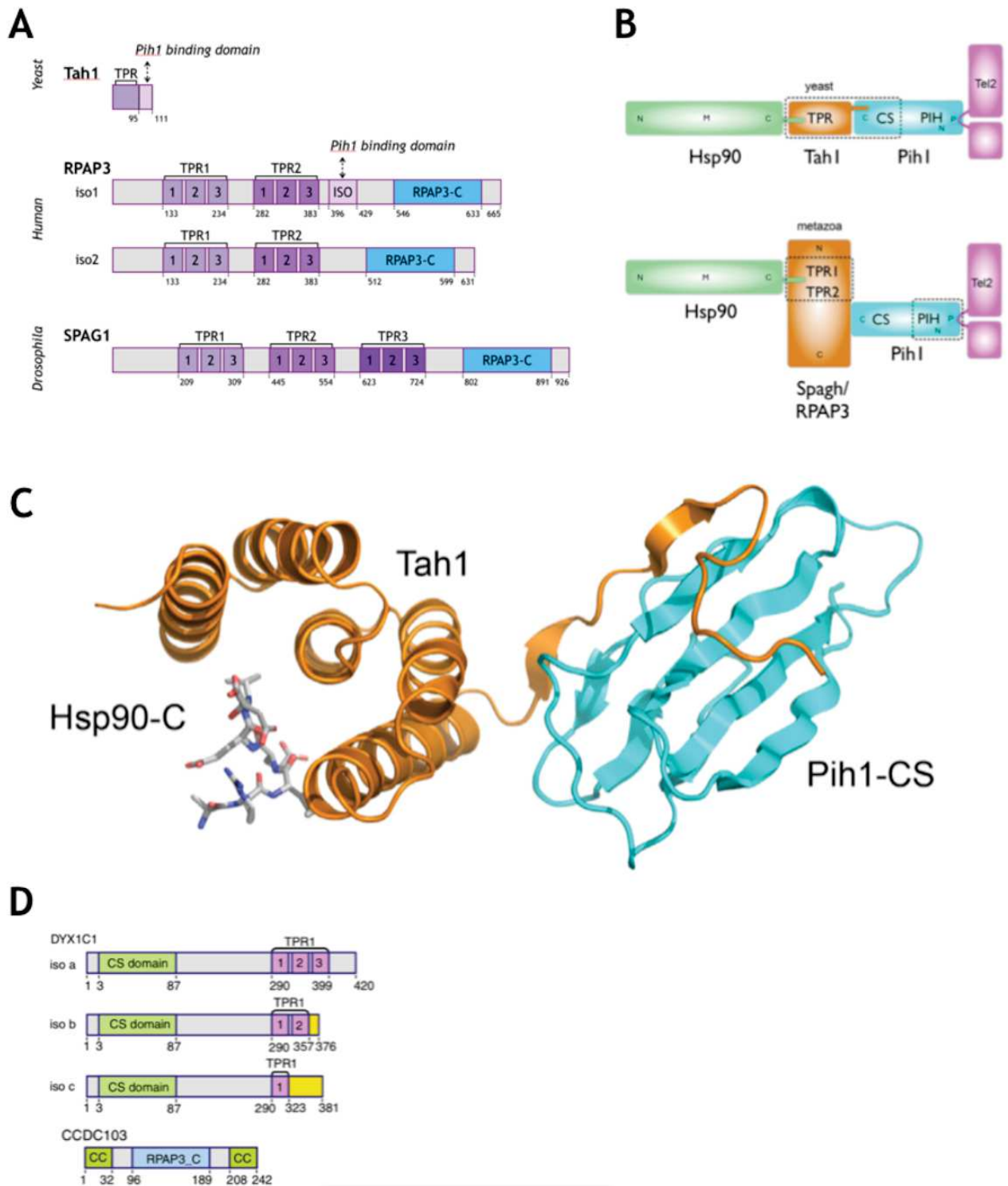


Figure 8 : Structure de la protéine RPAP3

(A) Architecture de domaine de RPAP3 dans la levure, l'homme et la drosophile.

(B) Schéma des interactions qui relie RPAP3 à HSP90 et PIH1D1/Pih1. N, M et C représentent respectivement les domaines N-terminal, Médian et C-terminal de HSP90. TPR, « tetratricopeptide repeat domain » ; CS, « CHORD domain-containing protein and Sgt1 domain » ; et PIH, « protein interacting with Hsp90 domain ».

(C) Représentation en rubans de la structure secondaire du domaine TPR de Tah1 (orange) lié au domaine CS de Pih1 (cyan) et un peptide de HSP90.

(D) Architecture des protéines humaines contenant un domaine RPAP3 C-terminal (RPAP3-C)

Adaptée à partir de Pal, 2014 ; Maurizy, 2018 ; Henri, 2018

La protéine humaine, RPAP3

Chez l'homme, RPAP3 possède quatre domaines. Un domaine N-terminal, deux domaines TPR et un domaine C-terminal. Contrairement à la protéine Tah1p, les deux domaines TPR ont une constitution classique des motifs TPR auxquels s'ajoute une hélice supplémentaire pour le domaine TPR1 (**Figure 8 A**). Chaque domaine TPR peut se lier non seulement à HSP90 (*Martino, 2018*) mais aussi HSP70 (*Benbahouche, 2014*). Cependant, les deux domaines TPR ont des affinités significativement différentes pour les peptides des HSP et le domaine TPR2 de RPAP3 permet la liaison initiale de HSP90 (*Henri, 2018*).

Nos collaborateurs ont déterminé, chez *E. Coli*, la structure du domaine C-terminal de RPAP3 (domaine absent chez *S. cerevisiae*) et ont montré qu'il est composé de huit hélices α qui s'assemblent pour former un objet globulaire (*Maurizy, 2018*). Ce domaine possède également une boucle en début de séquence qui protège plusieurs acides aminés hydrophobes contre les solvants et rend le domaine RPAP3 C-terminal soluble (*Maurizy, 2018*). C'est via ce domaine que RPAP3 s'associe avec RUVBL1 et RUVBL2 et certains clients du R2TP. La liaison RPAP3/RUVBL est directe tandis il n'est pas clair si la liaison avec les clients est directe ou via les RUVBL puisque leur association avec RPAP3-Cter se fait de manière coopérative avec la présence des RUVBL (*Maurizy, 2018*). Le génome humain comporte d'autres protéines portant des domaines similaires à RPAP3. La protéine SPAG1 contient un domaine CTER comme RPAP3 et également trois domaines TPR (**Figure 8 A**). DYX1C1 composé d'un domaine CTER mais aussi de domaine TPR variable selon les isoformes (**Figure 8 D**). CCDC103 est composé d'un domaine CTER mais aussi d'un domaine NTER qui reconnaît la dynéine (**Figure 8 D**).

Il est important de noter que RPAP3 humain a trois isoformes : une isoforme longue (iso1, 665 acides aminés), une isoforme plus courte de 34 acides aminés due à l'exclusion de l'exon 12 (iso2, 631 acides aminés), et une dernière isoforme ne possédant pas le domaine N-terminal. Seules les deux premières isoformes ont été caractérisées *in vivo* et seul RPAP3_ISO1 interagit avec PIH1D1 (*Yoshida, 2013*) (**Figure 8 A**). De plus, RPAP3_ISO1 se localise principalement dans le cytoplasme alors que le RPAP3_ISO2 est principalement nucléaire. Ceci suggère donc que l'épissage alternatif du RPAP3 pourrait réguler la formation complexe du R2TP ainsi que sa localisation et sa fonction (*Yoshida, 2013*).

Il a été montré que les acides aminés supplémentaires dans RPAP3_ISO1 étaient importants pour la liaison de RPAP3 avec PIH1D1 (*Martino, 2018*). Ils ont co-exprimé le domaine CS de PIH1D1 avec des constructions de RPAP3 marqué par GST et ont trouvé que RPAP3 entier tout comme la construction n'ayant que les résidus situés après le domaine TPR2 étaient suffisants pour stabiliser PIH1D1 (*Martino, 2018*). De plus, le domaine C-terminal globulaire de RPAP3 va faire

des boucles autour de PIH1D1 de sorte que deux brins β de RPAP3 vont venir former un feuillet β intermoléculaire avec deux autres brins β de PIH1D1 (Henri, 2018).

3. RUVBL1/RUVBL2 (Rvb1/Rvb2, Pontine/Reptine, TIP49/TIP48)

RuvABC est un complexe de trois protéines qui résolvent la jonction de Holliday créée lors de la recombinaison homologue chez les bactéries. La protéine RuvB est une ATPase qui forme des anneaux hexamériques (Kurokawa, 1999). Les protéines RUVBL (RuvB-like) ont été nommée ainsi à cause de leur similarité avec la protéine bactérienne RuvB (Shinohara, 1992). RUVBL1 et RUVBL2 sont les composants catalytiques du PAQosome. Les RUVBL appartiennent à la classe des ATPases AAA+ (« *ATPase associated with a variety of Cellular activity* »)(Neuwald, 1999). Cette classe comprend les enzymes de traitement de l'acide nucléique, les chaperons et les protéases qui contiennent des motifs conservés pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, comme les boîtes Walker A et Walker B (Walker, 1982), les résidus senseurs et le motif « *arginine finger* ». Les protéines AAA+ utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour exercer des forces mécaniques essentielles pour leurs activités biologiques (Gorynia, 2011). La nomenclature des protéines RUVBL1 et RUVBL2 est complexe et chacune est connue sous plusieurs noms, souvent associés à une espèce donnée. Dans la suite de cette étude, nous nommerons ces deux partenaires RUVBL1 et RUVBL2 s'il s'agit des protéines humaines, et Rvb1 et Rvb2 s'il s'agit des protéines de levure.

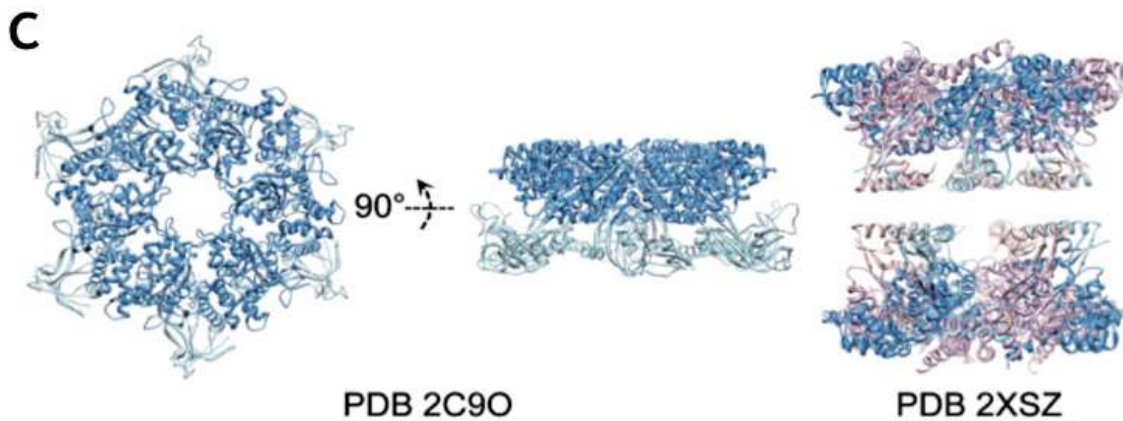
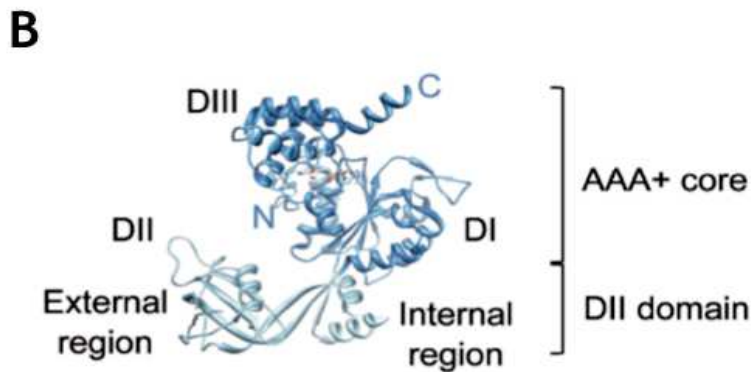
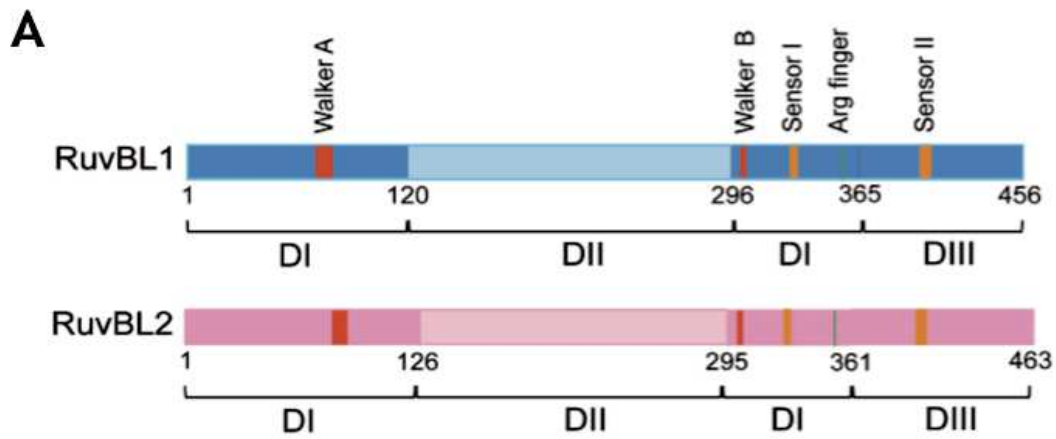
En terme de structure, chez l'homme, RUVBL1 et RUVBL2 sont des protéines de 456 et 463 acides aminés respectivement (463 et 471 pour Rvb1 et Rvb2 chez la levure) pour un poids moléculaire d'environ 50 et 51 kDa. RUVBL1 et RUVBL2 partagent une identité de séquence de 43% et une similitude de séquence de 65% et sont des homologues de l'ATPase et de l'hélicase RuvB bactériens (Putnam, 2001 ; Yamada, 2001). Les structures secondaires des deux protéines sont très homologues, avec une similitude des domaines et une conservation des motifs. Ces protéines sont constituées de trois domaines DI, DII et DIII (Miller and Enemark, 2016). Les deux protéines contiennent des motifs de liaison et d'hydrolyse ATP situés dans les domaines DI et DIII (Matias, 2006). Le domaine I (DI) contient les motifs Walker A et B, arginine finger et sensor I, tandis que le domaine III (DIII) contient le motif sensor II (**Figure 9 A**). Le motif Walker A (GPPGTGKT) est impliqué dans la fixation de l'ATP tandis que le motif Walker B (DEVH) est impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux motifs sont très conservés dans les ATPases, et ensemble, ils représentent le noyau AAA+ et sont suffisants pour former des cycles hexamériques

(Gorynia, 2011). Le domaine II (DII) correspond à une insertion de 160 à 170 acides aminés dans DI entre les motifs Walker A et B qui est unique à RUVBL1 et RUVBL2 par rapport aux autres membres de la famille AAA+ (Matias, 2006). DII adopte un repliement de liaison aux oligonucléotides fixé au cœur par une liaison flexible formée par deux brins β anti-parallèles (Petukhov, 2012). Il a été proposé que le DII soit important pour la liaison à l'ADN/ARN (Matias, 2006)

Les analyses structurales et les séquences conservées des espèces ont permis d'identifier quatre motifs des domaines DI et DIII, importants pour la liaison au nucléotides (Matias, 2006). Comme dit précédemment, le motif Walker A est impliqué dans la fixation de l'ATP. Il va prendre en charge les tri-phosphates et positionner le phosphate gamma correctement pour le clivage. Le motif Walker B est lui impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP. Il va interagir avec le magnésium et la molécule d'eau pour cliver l'ATP. En plus des motifs Walker, on retrouve dans le motif sensor I du DI et le sensor II du DIII, des acides aminés faisant des interactions polaires avec les phosphates bêta et gamma. Le sensor I a pour rôle de distinguer les nucléotides di- ou triphosphates en formant une liaison hydrogène avec le phosphate gamma. Le sensor II distingue les états liés ou non aux nucléotides. La coopération des différents monomères des RUVBL joue un rôle important dans l'hydrolyse de l'ATP (Matias, 2006).

L'activité ATPasique des RUVBL est faible mais nécessaire à leur activité (Rosenbaum, 2013). Il est cependant difficile de savoir comment cette activité contribue à leurs fonctions à cause des propriétés divergentes de RUVBL1 (TIP49a) et RUVBL2 (TIP49b) ainsi que de leurs assemblage homo- ou hétéro-oligomériques (Afanasyeva, 2014).

RUVBL1 et RUVBL2 peuvent chacune former un homo-hexamère présentant une molécule d'ATP entre chaque monomère (Petukhov, 2012) (**Figure 9 C**). Mais ensemble, les deux protéines peuvent s'organiser en hétéro-hexamère en alternant un monomère de chaque protéine (Gorynia, 2011). Jusqu'à récemment, les études structurales étaient réalisées sur les RUVBL ne contenant pas le DII en raison de la grande flexibilité de ce domaine. Mais des études plus récentes effectuées chez le champignon *Chaetomium thermophilum* ont permis d'obtenir une bonne résolution (de 2,9 et 3Å dans deux états de liaison à l'ADP : ADP/ADP et ADP/PP) sur les protéines entières. Elles ont montré que deux hétéro-hexamères pouvaient interagir pour former un hétéro-dodécamère (Silva-Martin, 2016). L'assemblage dodécamérique est médié par le domaine d'insertion (DII) présent sur l'une des faces de chaque hexamère RUVBL1/RUVBL2, l'autre face étant constituée par les domaines ATPases. (**Figure 9 C**). Chez la levure, Rvb1p et Rvb2p sont majoritairement sous forme hexamérique bien qu'une faible population soit dodécamérique (moins de 10%) (Jeganathan, 2015).



Lopez-Perrote A, et al., Nucleic Acids Res, 2012).

Figure 9 : Séquence et structure de RUVBL1 et RUVBL2 chez l'homme

(A) Représentation schématique des domaines de RUVBL1 et RUVBL2.

(B) Vue agrandie d'un monomère RUVBL1. Les domaines et les extrémités terminales N et C de la protéine sont indiquées.

(C) A gauche, structure atomique de l'homo-hexamère RUVBL1 (code PDB : 2C9O) (Matias, 2006). A droite, structure atomique du double anneau hétéro-hexamérique RUVBL1-RUVBL2 (code PDB : 2XSZ) (Gorynia, 2011).

Tiré de López-Perrote, 2012

RUVBL1 et RUVBL2 sont des protéines très conservées de la levure jusqu'à l'homme (*Nano and Houry, 2013*). Les deux gènes sont exprimés dans toutes les cellules de mammifères avec une expression accrue dans les testicules (*Makino, 2000*) et l'ARN de RUVBL1 est exprimé uniformément durant tout le cycle cellulaire (*Qiu, 1998*). L'expression de RUVBL1 et RUVBL2 est co-régulée par un mécanisme post-traductionnel dépendant du protéasome (*Izumi, 2010*). Chez la levure, l'expression des gènes RVB1 et RVB2 est régulée par les protéines Rvb1p et Rvb2p elles-mêmes (*Radovic, 2007*). De plus, les gènes de RVB1 et RVB2 sont essentiels pour la viabilité et à la croissance des levures *S. cerevisiae* (*Qiu, 1998*) et c'est également le cas chez *D. melanogaster* (*Bauer, 2000*) et *C. elegans* (*Matias, 2006*).

RUVBL1 et RUVBL2 sont deux protéines nécessaires à la viabilité cellulaire aussi chez les mammifères (*Nano and Houry, 2013*). Elles ne sont pas forcément associées à RPAP3 et PIH1D1 dans le complexe R2TP mais fonctionnent aussi comme entité RUVBL1/2 dans d'autres complexes. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans divers processus fondamentaux tels que la régulation de la transcription, la réponse aux dommages à l'ADN et l'apoptose (via les complexes de remodelage de la chromatine SWR1, INO80 et TIP60), le développement cellulaire, l'apparition des métastases cancéreuses et la régulation de la mitose (γ -tubuline) (*Jha and Dutta, 2009*).

Les RUVBL au sein du complexe INO80

Le complexe multi-protéiques INO80 a été caractérisé chez la levure et contient RUVBL1 et RUVBL2 (*Shen, 2000*). Ce complexe est impliqué dans la régulation de la transcription, la réplication et la réparation des ruptures de double brin d'ADN en catalysant la mobilisation des nucléosomes le long de l'ADN de manière ATP-dépendante (*Shen, 2000 ; Jin, 2005*). Les sous-unités de base du complexe INO80 sont communes entre la levure et l'homme : l'hélicase Ino80p, qui fait partie de la super-famille SNF2/SWI2 et qui est la sous-unité catalytique du complexe, Rvb1p, Rvb2p, l'actine (Act1p), Ies2 (« *INO80 subunits* ») qui régule l'activité ATPase (*Willhoft, 2016*) et Ies6 qui, en association avec Arp5, couple l'hydrolyse de l'ATP au glissement des nucléosomes (*Willhoft, 2016*), et les protéines liées à l'actine Arp4 (« *Actin-related proteins 4* »), Arp5 et Arp8 qui interagissent chacun avec un certain type d'histone (*Willhoft and Wigley, 2020*). A la fois chez la levure et chez l'homme, INO80 présente une activité de remodelage du nucléosome dépendant de l'ATP et une activité ATPase activée par l'ADN et le nucléosome (*Jin, 2005*).

Chen et al. ont montré qu'au sein du complexe humain INO80, RUVBL1 et RUVBL2 s'associent à une région d'insertion dans le domaine ATPase de la protéine Ino80 (Ino80INS) (*Chen, 2011*). *Zhou et al.* ont également montré que cette région d'insertion favorise la dodécamérisation des Rvb (*Zhou, 2017*). Ils ont montré par des techniques de Spectrométrie de Masse en condition native, que deux ou trois Ino80INS se liaient sur un dodécamère Rvb1p/Rvb2p.

De plus, l'ajout d'ATP dans le milieu entraîne la dissociation des dodécamères en hexamères. Ino80p va donc maintenir les Rvb sous forme dodécamériques afin qu'ils servent d'échafaudage pour l'assemblage des sous-unités du complexe INO80 avant l'hydrolyse de l'ATP qui va changer la conformation des Rvb et les dissocier du complexe (Tosi, 2013). Le rôle du complexe INO80 au niveau des cassures double brin est d'enlever le variant d'histone H2AZ pour permettre la réparation par recombinaison homologe (Alatwi and Downs, 2015). De plus, le complexe INO80 de la levure prévient la formation des nucléosomes autour des cassures (Morrison and Shen X, 2009). Les Rvb sont recrutées au niveau de la cassure double brin de l'ADN grâce aux protéines Arp5p, Arp8p et Ino80p qui reconnaissent la phosphorylation du variant d'histone H2AX. Le complexe INO80 va ensuite travailler en coopération avec le facteur de transcription YY1 (« *Ying Yang 1* »), une protéine Polycomb contenant un motif en doigt de zinc qui lie préférentiellement les jonctions de Holliday (Wu, 2007). L'activité ATPase de RUVBL2 va ensuite être nécessaire à YY1 pour stabiliser la formation du filament de RAD51 au niveau du simple brin d'ADN (López-Perrote, 2014).

β-caténine et régulation de la transcription

La β-caténine est un acteur majeur de la voie de signalisation Wnt. Elle interagit avec les facteurs de transcription de la famille LEF/TCF (« *lymphoïd enhancing factor / T-Cell Factor* »). RUVBL1 et RUVBL2 régulent différemment l'activité transcriptionnelle de la β-caténine tout en se liant au même domaine de la protéine, ce qui suggère une compétition entre elles (Bauer, 2000). RUVBL1 augmente l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la β-caténine, tandis que RUVBL2 réprime la transcription des gènes en aval de ces gènes cibles (c-Myc, ITF-2 et Cox-2) (Bauer, 2000). RUVBL1 s'associe avec TIP60 pour agir comme médiateur dans la régulation de la transcription (Feng, 2003). RUVBL2 va recruter HDAC1 et 2 et ainsi réprimer l'activité transcriptionnelle des cibles de la β-caténine telle que la cyclin D1 (Bauer, 2000). Le rôle de RUVBL1 et RUVBL2 sur la β-caténine peut cependant être inhibé. La protéine Hint1 (« *histidine triad nucleotide-binding protein1* ») supprime l'activation de RUVBL1 sur la transcription médiée par la β-caténine en dissociant le complexe RUVBL1/RUVBL2 (Weiske and Huber, 2005). APPL1/2 (« *Adaptor proteins containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine binding domain, and Leucine zipper domain* ») peut lever la répression de la transcription par RUVBL2 en diminuant les interactions entre RUVBL2, HDAC et la β-caténine (Rashid, 2009).

Assemblage du fuseau mitotique

Plusieurs études ont signalé l'implication essentielle de RUVBL1 et de RUVBL2 dans la mitose, notamment dans l'assemblage du fuseau mitotique (Gartner, 2003 ; Sigala, 2005 ; Ducat,

2008). De plus, les deux ATPases subissent une importante relocalisation subcellulaire durant la mitose (Sigala, 2005 ; Gentili, 2015). En interphase, RUVBL1 et RUVBL2 sont principalement nucléaires avant d'être relocalisés dans le cytoplasme après l'entrée en mitose et d'être complètement exclus des chromosomes une fois en métaphase (Gartner, 2003 ; Sigala, 2005). Lors de la transition anaphase-télophase, les deux protéines se localisent au niveau des centrosomes de manière compacte avant de former deux foyers distincts en télophase : RUVBL1 sera alors co-localisée avec la β -tubuline aux extrémités de l'anneau contractile tandis que RUVBL2 va être concentrée au centre de l'anneau (Gentili, 2015). La déplétion de RUVBL1 entraîne de nombreux défauts mitotiques dont une augmentation de la mort mitotique, un retard de début d'anaphase, un défaut de fuseau mitotique, entraînant un mauvais alignement des chromosomes (Gartner, 2003 ; Ducat, 2008 ; Gentili, 2015). La déplétion de RUVBL2 n'a pour effet que d'amplifier les défauts observés pour la déplétion de RUVBL1 (Ducat, 2008). Il a été montré que RUVBL1 est impliquée dans l'assemblage du fuseau mitotique et la formation du centrosome en régulant la localisation de l'anneau de γ -tubuline et de l'ILK (« Integin-Linked Kinase ») (Gartner, 2003 ; Fielding, 2008). En fin de mitose, RUVBL1 et RUVBL2 vont se ré-associer en hétéro-complexe et participer à la décondensation de la chromatine (Magalska, 2014).

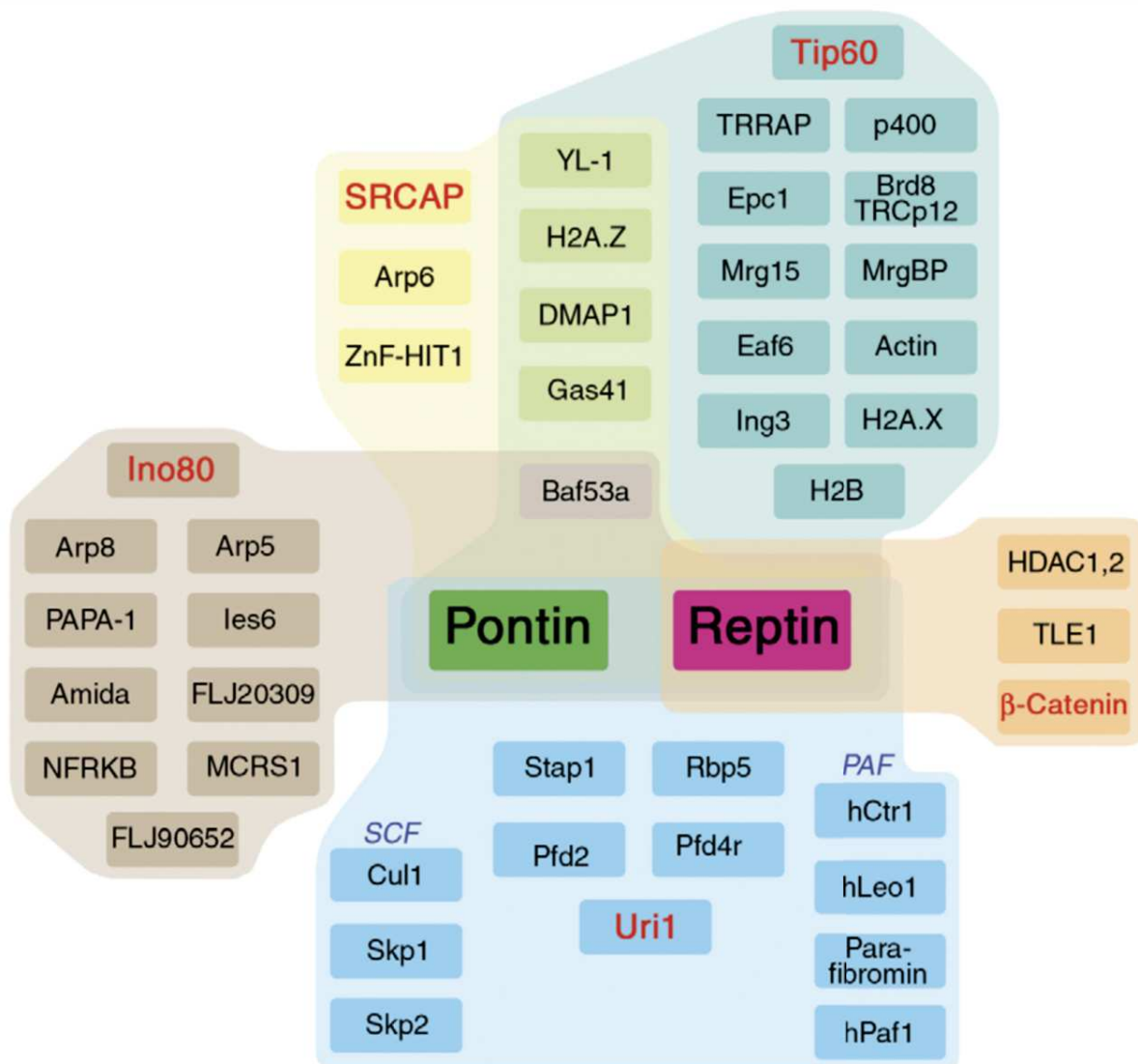


Figure 10 : Composants des complexes associés à Pontine et Reptine

Les compositions des complexes Ino80 (humain); humain SRCAP (humain); Tip60 (drosophile); Uri1 (humain); β -caténine (humain). Les sous-unités donnant le nom des différents complexes sont marquées en rouge; dans le groupe Uri1, les sous-ensembles SCF et PAF sont également étiquetés.

Tiré de Gallant, 2007

D. Les substrats du système HSP90/ R2TP

Au cours de la dernière décennie, de nombreux chercheurs ont montré l'implication du R2TP et du PAQosome dans l'assemblage et la maturation de complexes multi-protéiques. Les cibles bien connues du R2TP sont les snRNP U4 et U5 ainsi que les snoRNPs (*Kakihara and Saeki, 2014 ; Cloutier, 2017 ; Boulon, 2008 ; Massenet, 2017*). D'autres cibles impliquent un complexe plus large nommé PAQosome comme les ARN Polymérase I, II et III ainsi que les complexes PIKKs (« *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases* ») qui incluent mTOR (*Cloutier, 2017 ; Boulon, 2010 ; Hořejší, 2014 ; Lynham and Houry, 2018*).

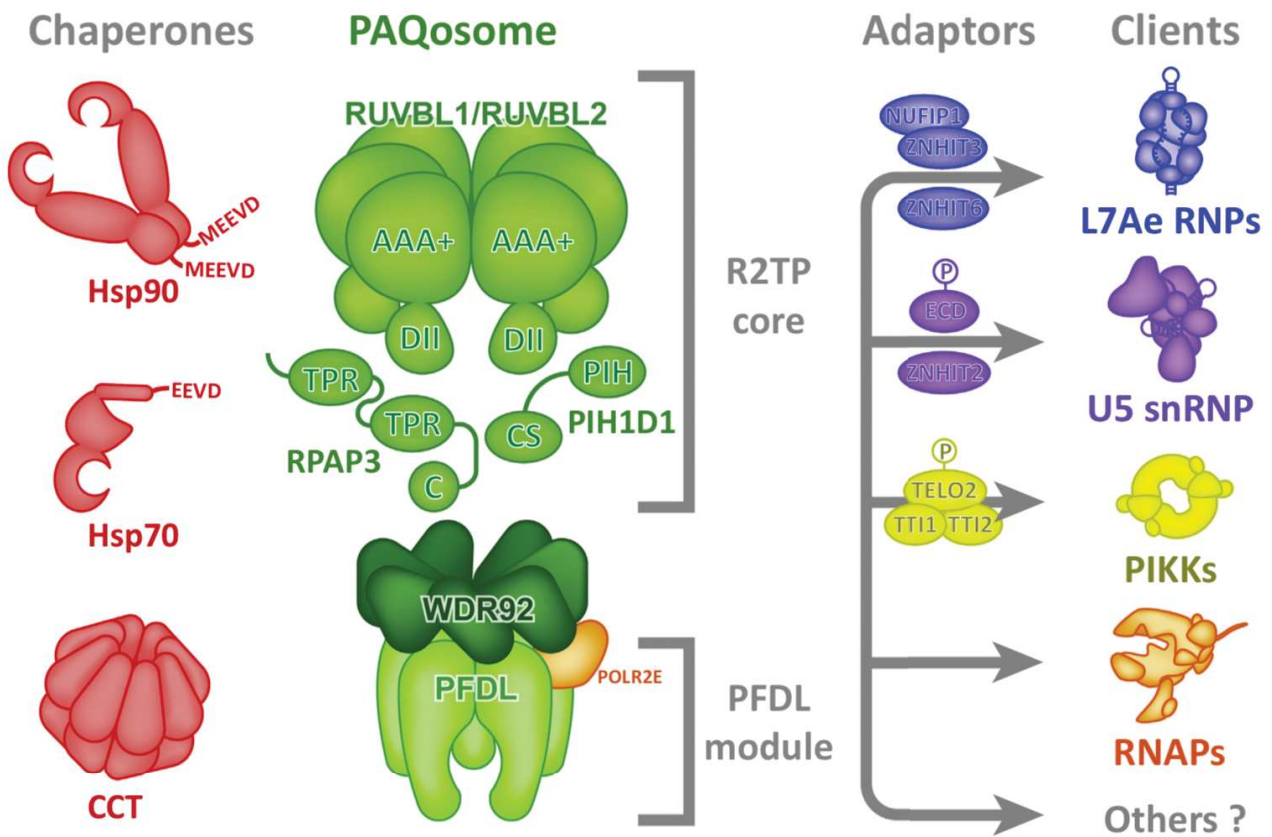


Figure 11 : Schéma de la structure du PAQosome avec ses adaptateurs et ses clients.

Le PAQosome est représenté en vert, les chaperons associés sont en rouge, les adaptateurs connus sont au niveau des flèches à droite et les complexes clients sont tout à droite. Les composants du R2TP et du module préfoldine ont été détaillés. Toutes les interactions ne sont pas bien établies ou caractérisées.

Tiré de Houry, 2018

1. Assemblage des snRNP U4 et U5 par le système HSP90/R2TP

Le spliceosome est composé de cinq snRNPs (U1, U2, U4, U5 et U6) responsables de l'épissage des pré-ARN messagers (Matera and Wang, 2014). Chaque snRNP est composé d'un ARN simple brin (snRNA) et de protéines spécifiques. Les snRNP U1, U2, U4 et U5 contiennent également sept protéines Sm assemblées en anneau (Matera and Wang, 2014). Les snRNP agissent principalement dans le noyau. Leur biogenèse et maturation se fait cependant dans différents compartiments cellulaires. Les snRNA nouvellement transcrits sont exportés dans le cytoplasme en complexe avec CBC, PHAX, ARS2 et l'exportine CRM1 (Ohno, 1998 ; Hallais, 2013). Là, ils vont être pris en charge par le complexe SMN (« Survival Motor Neuron ») qui va charger les sept protéines Sm sur le snRNA. (Fischer, 1997 ; Grimm, 2013) et ainsi former le snRNP. Ensuite le complexe SMN va recruter TGS1 (« TrimethylGuanosine Synthase 1 ») qui va hyper-méthyle la coiffe m7G en 5' du snRNA et le snRNP va être réimporté dans le noyau grâce à un complexe composé de Snurportin et Importin β (Narayanan, 2004 ; Mouaikel, 2002). Les snRNP vont ensuite se retrouver dans les corps de Cajal (CB) pour finir leur maturation. Le snRNA va subir d'autres modifications post-traductionnelles (Jády, 2003) et se lier avec ses protéines spécifiques pour former la tri-snRNP U4/U6-U5 (Staněk, 2003 ; Schaffert, 2004 ; Darzacq, 2002 ; Klingauf, 2006).

Récemment, le complexe PAQosome a été montré comme nécessaire dans l'assemblage des protéines spécifiques des snRNP (Bizarro, 2015 ; Cloutier, 2017 ; Malinová, 2017). Notre laboratoire a montré que certaines protéines spécifiques des snRNP U4 et U5 font intervenir le complexe HSP90/R2TP (Malinová, 2017). Le tri-snRNP U4/U6-U5 est le plus grand complexe spliceosomal préassemblé, contenant les snRNA U5 et U4-U6 appariés et plus de 30 protéines (Stevens, 2001). Les interactions entre les protéines de la tri-snRNP ont été étudiées à la fois en double hybride chez la levure et par des essais de liaison *in vitro* (Liu S, 2006 ; van Nues and Beggs, 2001).

La snRNP U4 joue un rôle central dans l'assemblage de la tri snRNP. Il va s'associer avec sa protéine cœur 15.5K qui va recruter la protéine PRP31 (Vidovic, 2000 ; Watkins, 2000 ; Nottrott, 2002). PRP31 est très similaire à NOP58, une protéine cœur des snoRNP à boîte C/D. Elles possèdent toutes les deux un domaine NOP qui lie l'interface 15.5K/ARN (Liu, 2007) et un domaine coiled-coil nécessaire pour l'interaction avec d'autres protéines (Makarova, 2002 ; Liu, 2007). Bizarro *et al.*, ont montré que PRP31 interagissait avec NUFIP et ZNHIT3 (Rsa1 et Hit1 chez la levure), des adaptateurs du système HSP90/R2TP mais également avec RUVBL1/RUVBL2 (Bizarro, 2015). Ils ont également montré *in vivo* que PRP31 pouvait s'associer faiblement avec la snRNP U4 sans la présence de la protéine 15.5K alors que cette dernière est nécessaire pour l'interaction *in vitro* (Schultz, 2006). Cette interaction résiduelle vient du fait que NUFIP se lie à PRP31 et 15.5K et forme une plateforme d'assemblage de la snRNP U4 (Bizarro, 2015 ; Bizarro,

2014). La déplétion de NUFIP entraîne une accumulation du snARN U4 dans les CB et une diminution drastique de son interaction avec PRP31 démontrant le rôle du co-facteur dans l'assemblage de la snRNP U4. En effet, NUFIP va interagir avec 15.5K et PRP31 et les présenter au R2TP via PIH1D1 (*Boulon, 2008 ; Bizarro, 2014*).

Au sein du snRNP U5, PRPF8 fonctionne comme une plateforme d'interactions protéine-protéine et protéine-ARN et maintient toutes les protéines ensemble (*Nguyen, 2015*). Chez la levure, un complexe stable Prp8p-Snu114p-Aar2p est importé dans le noyau puis Brr2p remplace Aar2p (*Boon, 2007*). PRPF8 est également impliqué dans le positionnement du pré-ARNm client. En effet, il forme des liaisons stables au sein de la tri-snRNP ainsi qu'avec le pré-ARNm client (*Turner, 2006 ; Galej, 2013*). *Cloutier et al* ont montré l'interaction des protéines du snRNP U5 avec le cofacteur ZNHIT2 (*Cloutier, 2017*). Ils avaient déjà identifié ZNHIT2 comme un interactant du R2TP auparavant (*Cloutier, 2010*). Grâce à son domaine HIT, ZNHIT2 va interagir avec RUVBL2 afin de réguler l'assemblage des protéines du snRNP U5. En effet, après la déplétion de ZNHIT2, ils observent une diminution de l'association de PRPF8 et EFTUD2 avec les RUVBL.

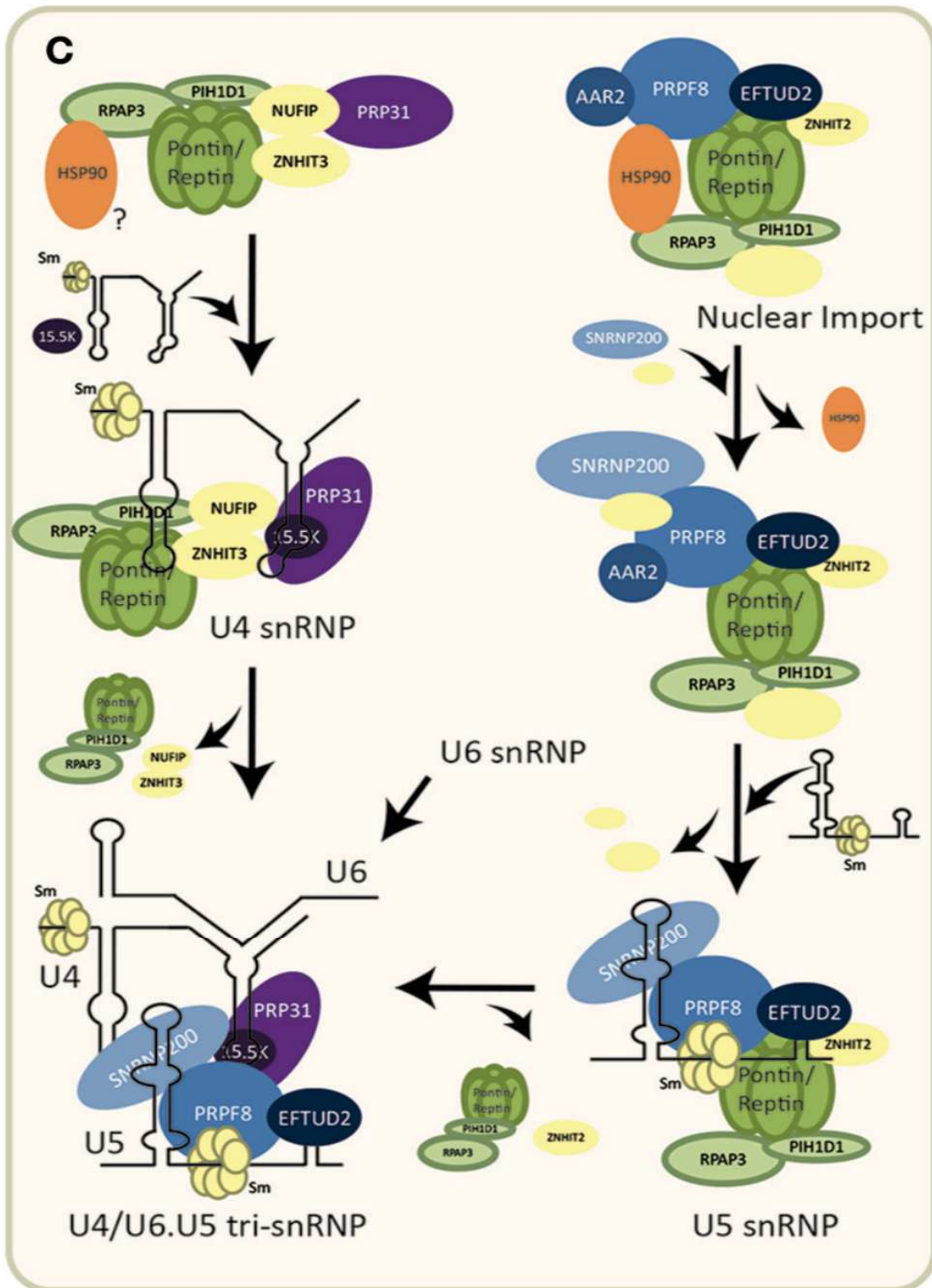


Figure 12 : Assemblage des snRNP U4 et U5.

Pour la snRNP U4, le R2TP est pré-assemblé avec les co-facteurs (en jaune) et PRP31 (en violet). Le recrutement de 15.5K favorise alors la liaison de la snRNP U4. Pour la snRNP U5, un complexe précurseur est d'abord assemblé dans le cytoplasme par le R2TP et HSP90. Après l'importation nucléaire, la snRNA U5, et d'autres protéines snRNP sont incorporées. U4 peut alors former la tri-snRNP avec U5 et U6.

Tirée de Mao and Houry, 2017

2. Assemblage des PIKK par le système HSP90/R2TP

Les PIKK sont des transducteurs de signaux impliqués dans divers processus cellulaires. Il existe six PIKK chez les mammifères: ATM, ATR et DNA-PKc, toutes impliquées dans la réparation de l'ADN (*Shiloh, 2003*); SMG1, impliquée dans la dégradation des ARNm (*Yamashita, 2005*); TRRAP, protéine adaptatrice dans de nombreux complexes de remodelage de la chromatine (*McMahon, 2000*); et mTOR, impliquée dans le métabolisme, la croissance et la survie cellulaire (*Wullschleger, 2006*; *Saxton and Sabatini, 2017*). Il existe deux complexes mTOR distincts: mTORC1 qui contrôle la croissance cellulaire et la synthèse protéique et mTORC2 responsable de la signalisation de survie cellulaire (cf **Chapitre 2**). PIH1D1 interagit spécifiquement avec mTORC1 mais pas avec mTORC2 et son interaction est nécessaire pour l'activité mTORC1 (*Kamano, 2013*). Le complexe RUVBL1/2-TTT est également impliqué dans la dimérisation et la localisation lysosomale de mTORC1 en condition de stress métabolique (*Kim, 2013*). La coordination de la progression du cycle cellulaire et du métabolisme de l'ADN est essentielle pour le maintien de la stabilité génomique. ATM et ATR sont le régulateur clé de la réponse aux dommages à l'ADN (*Shiloh, 2003*; *Awasthi, 2016*). Lorsque l'ADN est endommagé, ATM et ATR sont recrutés sur les sites endommagés et activent Chk2 (« *Checkpoint Kinase 2* ») et Chk1 (« *Checkpoint Kinase 1* ») pour déterminer le devenir cellulaire. L'activation ATM est régulée par le complexe MRN (« *Mre11-Rad50-Nbs1* ») (*Paull and Lee, 2005*). Récemment, il a été montré que le complexe MRN est l'une des cibles de R2TP (*von Morgen, 2017*). PIH1D1 va reconnaître la protéine Mre11 phosphorylée par la CK2. Le R2TP régule l'activité du complexe MRN dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN en stabilisant Mre11 (*Kakihara, 2020*).

Le complexe PAQosome, en coopération avec TEL2 (« *Telomere maintenance 2* ») et HSP90, permet l'assemblage et la stabilité des protéines de la famille des PIKK (*Hořejší, 2010*; *Takai, 2010*). Tel2p a un rôle de maintenance des télomères chez la levure mais pas chez les mammifères où TEL2 est essentiel pour le développement embryonnaire et la croissance cellulaire (*Takai, 2007*). Des analyses par protéomique faites chez la levure ont permis d'identifier deux partenaires de Tel2: Tti1 et Tti2 (*Hayashi, 2007*: *Schizosaccharomyces pombe*; *Shevchenko, 2008*; *Saccharomyces cerevisiae*). Ensemble, les trois protéines forment le complexe TTT. Les orthologues humains de TTI1 et TTI2 ont également été détectés en complexe avec TEL2 (*Takai, 2010*). RUVBL1 et RUVBL2 ont également été identifiés en interaction avec les trois protéines. Les deux ATPases affectent d'ailleurs les niveaux d'ARNm des PIKK jouant ainsi un rôle dans leur expression (*Izumi, 2010*). TEL2, TTI1 et TTI2 interagissent aussi avec les chaperons HSP70 et HSP90 ainsi qu'avec RPAP3 et PIH1D1.

Le complexe TTT sert d'adaptateur faisant le lien entre le PAQosome et les PIKK, permettant ainsi l'assemblage et la stabilité des PIKK (*Takai, 2007*; *Hayashi, 2007*; *Anderson and Blackburn,*

2008 ; Hurov, 2010 ; Hořejší, 2010). TEL2 interagit avec les PIKK via leur domaine HEAT (« *Huntington-Elongation factor 3-A subunit of protein phosphatase 2A-TOR1* ») (Perry and Kleckner, 2003). Plusieurs études ont permis de caractériser l'interaction du complexe TTT avec le système HSP90/R2TP (Zhao, 2005 ; Zhao, 2008 ; Hořejší, 2010 ; Pal, 2014). Au sein du R2TP, PIH1D1 reconnaît via son domaine NTER les substrats phosphorylés (Hořejší, 2014 ; Pal, 2014). La Casein-Kinase 2 (CK2) phosphoryle TEL2 et TTI1 (Hořejší, 2010 ; Rao, 2014) au niveau d'un motif consensus DSDD/E reconnu par le domaine NTER de PIH1D1 (Hořejší, 2014 ; Pal, 2014). Bien que CDC37 n'interagisse pas directement avec le complexe TTT-R2TP-HSP90, il contribue à l'établissement de l'interaction TTT-HSP90. Comme les autres protéines kinases, le CK2 dépend des activités de CDC37 pour la stabilité des protéines (Miyata and Nishida, 2004 ; Mandal, 2007). CDC37 contrôle donc également la stabilité protéique des PIKK en modulant l'activité de CK2.

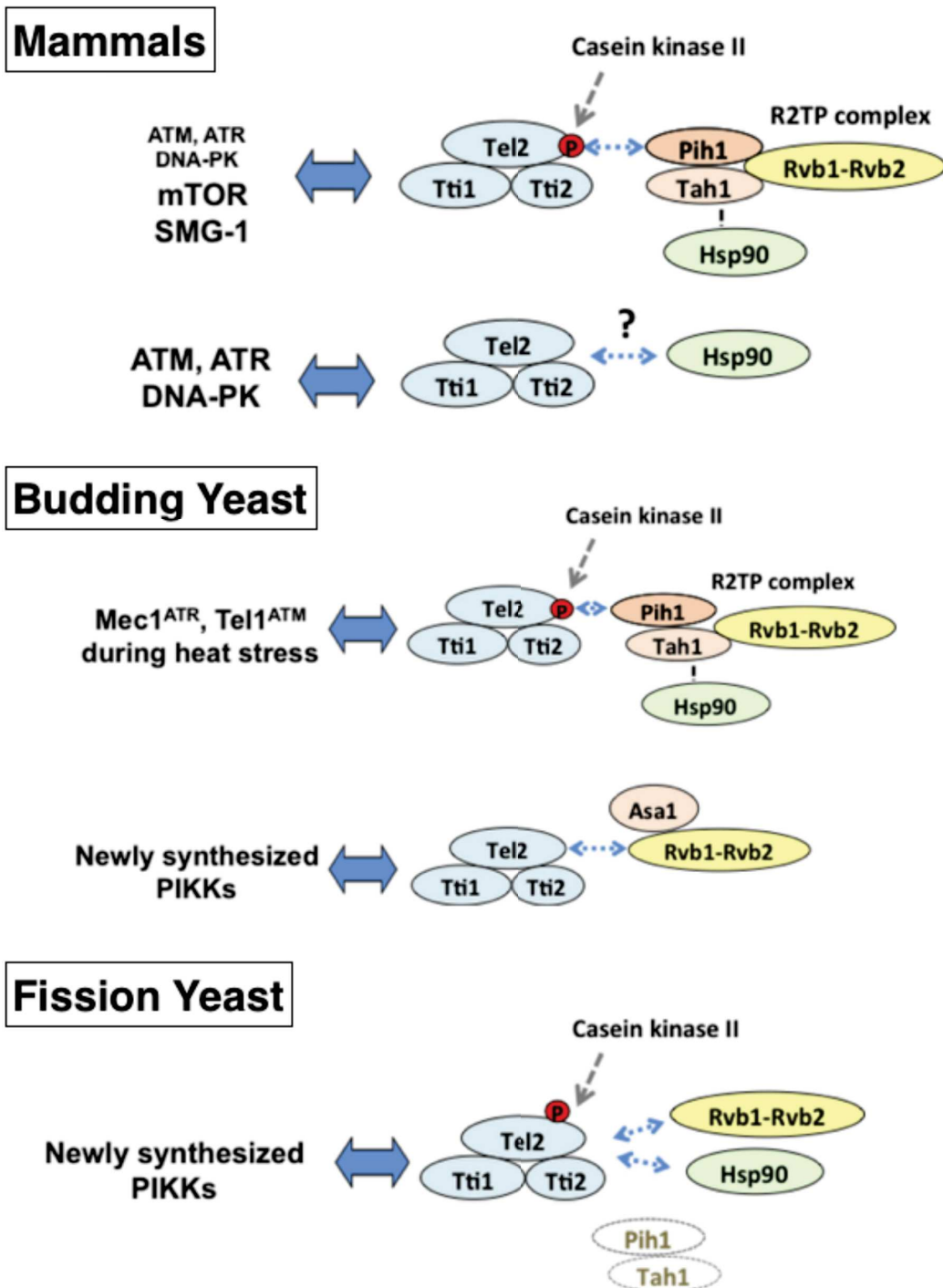


Figure 13 : Prise en charge des PIKK par le système HSP90/R2TP via le complexe TTT

La voie TTT dans les cellules de mammifères. La voie TTT-R2TP contribue principalement à la stabilisation des protéines du mTOR et du SMG1. TTT semble connecter Hsp90 indépendamment de R2TP et réguler la stabilisation des protéines de ATM, ATR et DNA-PK.

La voie TTT dans la levure *S. cerevisiae*. La voie TTT-Asa1 joue un rôle clé dans la stabilisation des protéines des PIKK nouvellement synthétisés alors que la voie TTT-R2TP contribue à la stabilisation des protéines Mec1^{ATR} et Tel1^{ATM} à des températures plus élevées.

La voie TTT dans la levure *S. Pombe*. La voie TTT joue un rôle clé dans la stabilisation des protéines des PIKK nouvellement synthétisées. CK2 phosphoryle TEL2, mais la phosphorylation n'est pas nécessaire pour la stabilisation protéique des PIKK. Aucune protéine Pih1p ou Tah1p n'est trouvée dans la levure *S. Pombe*.

Tiré de Sugimoto, 2018

3. D'autres substrats du système HSP90/R2TP

Le complexe R2TP a été impliqué dans l'assemblage de ARN polymérase (*Boulon, 2010, Cloutier, 2010*) et petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP pour « *small nucleolar RiboNucleoProtein* ») dans les cellules humaines (*Boulon, 2008*). Ce rôle dans l'assemblage des snoRNP a dans le même temps été mis en évidence chez la levure (*Zhao, 2008*). Les complexes snoRNP sont regroupés en deux familles d'après le snoARN qui le constitue : snoRNP à boîte C/D ou snoRNP à boîte H/ACA, chacun en complexe avec des protéines spécifiques. Les snoRNP sont impliqués dans la modification de petits ARN nucléaires (snARN) et des ARN ribosomiques (ARNr) (*Decatur and Fournier, 2003 ; Ojha, 2020*). Ils interviennent aussi dans la maturation des ARNr en favorisant le clivage des précurseurs. Les snoRNP à boîte C/D catalysent des 2'-O-méthylations du ribose sur l'ARN cible tandis que les snoRNP à boîte H/ACA guident des pseudouridylations. (*Massenet, 2017*). La famille des snoRNA inclue aussi l'ARN de la télomérase et les scaARN (« *specific cajal bodies ARN* »). L'ensemble de ces ARN nécessiterait le système HSP90/R2TP pour leur assemblage en snoRNP stables et catalytiquement actifs (*Massenet, 2017* pour revue).

Les snoRNP à boîte C/D

Les snoARN à boîte C/D sont des ARN non-codants transcrits par l'ARN Polymérase II. Chez les eucaryotes, les snoRNP à boîte C/D matures sont associés à quatre protéines cœur : la protéine SNU13 ou 15.5K (Snu13 dans la levure), NOP56, NOP58 et la fibrillarine ou FBL (Nop1 dans la levure) qui est la méthyltransférase. Les premières étapes de la voie d'assemblage des snoRNP à boîte C/D ont été étudiées dans le laboratoire notamment pour les protéines NOP58 et SNU13. La stabilité de ces protéines dépend de l'activité de HSP90 montrant qu'elles sont des clients de ce chaperon (*Boulon, 2008*). Elles sont reconnues par le R2TP mais via une protéine adaptatrice tels que NOPCHAP1 pour NOP58 (*Abel, 2021*) et NUFIP pour SNU13 (*Boulon, 2008 ; Bizarro, 2014*). RUVBL1 et RUVBL2 peuvent ensuite interagir directement avec NOP58 ou SNU13 pour remodeler ces protéines au sein du complexe snoRNP (*McKeegan, 2009*). Des données récentes du laboratoire montrent que le recrutement des HSP comme HSP70 et HSP90 constitue une étape précoce qui peut aussi avoir lieu avec des mutants de NOP58 incapables de s'assembler à SNU13 (*Abel, 2021*). Le laboratoire a mis en évidence l'existence d'un complexe uniquement protéique regroupant plusieurs protéines cœur des snoRNP à boîte C/D en association avec d'autres facteurs comme ZNHIT3 et ZNHIT6 et les RUVBL1 et 2. Le facteur C12ORF45, renommé NOPCHAP1, qui est un co-facteur de RUVBL1, s'associe spécifiquement à NOP58 et forme un complexe quaternaire avec RUVBL1/2 qui pourrait favoriser le recrutement de NOP58 sur le R2TP puis son transfert sur ce complexe protéique précurseur (*Bizarro, 2014 ; Abel, 2021*). Excepté le facteur

NOPCHAP1, on retrouve les mêmes facteurs chez la levure *S. cerevisiae* et l'homme mais les détails des interactions peuvent différer sensiblement entre les deux systèmes. NOP58 chez la levure (Nop58p) interagit avec Pih1p, l'homologue de PIH1D1 et possède un motif DSDD/E qui pourrait bien participer à l'interaction alors que ce n'est pas le cas pour NOP58 chez l'homme qui fait intervenir NOPCHAP1 pour se lier à RUVBL1/2. NUFIP aussi est très différent entre l'homme et la levure (appelé Rsa1p chez *S. cerevisiae*) mais les deux se lient à SNU13 et Snu13p via un domaine PEP (Boulon, 2008) et forment un complexe avec ZNHIT3 ou son homologue Hit1p respectivement (Rothé, 2014).

Les snoRNP à boîte H/ACA

Comme les snoRNA à boîte C/D, les snoARN à boîte H/ACA sont des ARN non-codants transcrits par l'ARN Polymérase II. Dans ces ARN, les boîtes H/ACA sont importantes pour la stabilité de l'ARN, ainsi que son association avec les protéines cœur du snoRNP et sa localisation dans le nucléole. Les snoRNP à boîte H/ACA sont composés d'un snoRNA avec un motif H/ACA et de quatre protéines cœur : la dyskerine (DKC1) qui est la sous-unité catalytique, GAR1, NOP10 et NHP2. Cette dernière est une protéine de la famille L7Ae comme SNU13 et qui se lie à un motif ARN en « *K-turn* » (Mannoor, 2012). Plusieurs interactions entre les facteurs d'assemblage des snoRNP à boîte H/ACA et le système HSP90/R2TP ont été décrites. Notre laboratoire a montré par double hybride que NUFIP interagissait avec NHP2 via le domaine PEP (Boulon, 2008). NHP2 pourrait donc être recruté sur le R2TP via le co-facteur NUFIP. RUVBL1/2 peuvent stabiliser les intermédiaires d'assemblage comme le complexe pré-snoRNP et dissocier les facteurs d'assemblage des protéines cœur pour favoriser la maturation. Notamment, il a été montré que les RUVBL1/2 sont nécessaires pour dissocier SHQ1 de DKC1 (Machado-Pinilla, 2012). De plus, PIH1D1 interagit directement avec DKC1. Cela a conduit à un modèle où PIH1D1 adresserait les RUVBL1/2 sur le complexe DKC1-SHQ1, permettant ainsi grâce à leur activité ATPasique le relargage de SHQ1 (Machado-Pinilla, 2012). NAF1 est un autre facteur d'assemblage présent dans le pré-snoRNP et qui est remplacé par GAR1 pour former la particule mature (Darzacq, 2006). NAF1 et SHQ1 ne font cependant pas parti des particules catalytiquement actives (Grozdanov, 2009). L'étude du rôle du système HSP90/R2TP ou des RUVBL seules dans ce différents processus de remodelage reste encore à étudier. Le complexe chaperon SMN semble intervenir dans l'assemblage des snoRNP à boîte H/ACA (Whitehead, 2002) et pourrait collaborer avec la machinerie HSP90/R2TP comme cela a été montré pour la snRNP U4 (Bizarro, 2015).

La télomérase

La télomérase est responsable de l'ajout de répétitions de télomères, séquences de nucléotides

répétitives, aux extrémités des chromosomes, les protégeant des dommages à l'ADN ou de l'érosion (Maciejowski and de Lange, 2017). La télomérase est un complexe RNP dont l'ARN sert d'amorce pour l'ajout des répétitions d'ADN aux télomères. Le complexe est composé de la sous-unité catalytique TERT (« *TElomerase Reverse Transcriptase* ») et du RNP TERC (« *TElomerase RNA Component* »). Cet ARN, appelé hTR (« *Telomerase RNA* ») contient, en plus de la partie servant d'amorce à l'ajout de nucléotides, un motif à boîte H/ACA nécessaire à sa stabilité. Jády *et al.*, ont établi que hTR est un scaARN (« *small Cajal body-specific RNAs* ») qui s'accumule dans les corps de Cajal et non dans le nucléole comme les autres snoARN à boîte H/ACA (Jády, 2004). Cette localisation est dû à la présence de deux motifs CAB (« *Cajal Body Box* ») situé dans les boucles terminales des épingle à cheveux 5' et 3' des boîtes H/ACA (Richard, 2003). L'assemblage des protéines cœur H/ACA sur le complexe RNP TERC semble suivre le même schéma que pour les snoRNP à boîte H/ACA, où R2TP dissocie DKC1 de SHQ1, permettant à la DKC1 de rejoindre le motif snoRNP. Il a été montré que sa localisation est dépendante du cycle cellulaire (Jády, 2004). On ne comprend pas très bien comment la télomérase est adressée aux télomères. Certains télomères sont co-localisés avec les CB mais ce n'est pas toujours le cas. Chez l'homme, RUVBL1 et RUVBL2 ont été identifiés comme des sous-unités du complexe télomérase en cours de biogenèse (Machado-Pinilla, 2012). RUVBL1 et RUVBL2 pourraient aussi agir comme des facteurs d'assemblage dans le cadre du complexe R2TP et se dissocier après la formation du complexe télomérase mature (Venteicher, 2008 ; Machado-Pinilla, 2012). Cette idée a été renforcée par des observations selon lesquelles HSP90 fonctionne dans l'importation nucléaire de TERT (Jeong, 2016). Il est également possible que les RUVBL tiennent TERT sous une forme inactive jusqu'à ce que son activité soit nécessaire.

Les ARN Polymérase

Il a été montré que le PAQosome participe à l'assemblage des trois ARN polymérase (Jeronimo, 2007 ; Boulon, 2010). Ces trois gros complexes multi-protéiques sont essentiels pour la cellule et contiennent certaines sous-unités en commun. L'ARN Polymérase II (ARN Pol II) synthétise tous les ARNm et les ARN non codants coiffés. Une approche de protéomique quantitative a montré pour l'ARN Pol II, l'existence de deux sous-ensembles : les complexes associés à RPB1 (RPB1-RPB5-RPB8) et ceux associés à RPB3 (RPB2-RPB3-RPB10-RPB11-RPB12) qui interagissent chacun avec un ensemble particulier de facteurs d'assemblage et seule l'ARN Pol II entièrement assemblée est importée dans le noyau. (Boulon, 2010 ; Boulon, 2012). La protéine RPB5 peut participer à l'assemblage des ARN Polymérase en fournissant une grande surface d'interaction à la plupart des autres sous-unités (Acker, 1997). Dans le complexe ARN Pol

Il assemblé, RPB5 ne fait pas partie du domaine catalytique mais participe à la coordination de l'ouverture et de la fermeture de la l'ARN Pol II (*Bushnell, 2002 ; Cramer, 2000 ; Zaros, 2007*). Il a également été démontré que le RPB5 modulait la dynamique de l'élongation de transcription en influençant l'état de phosphorylation du CTD de RPB1 (*Martínez-Fernández, 2018*). De plus, RPB5 est une sous-unité commune aux trois ARN polymérase (*Mita, 2013 ; Pati and Weissman, 1989 ; Zaros, 2007*) et RPAP3 interagit également avec des sous-unités de l'ARN Pol I et III (*Jeronimo, 2007 ; Cloutier, 2010*). L'ensemble de ces données suggèrent que le PAQosome peut participer à l'assemblage des trois ARN polymérase.

Les sous-unités libres dans le cytoplasme du sous-ensemble RPB1 sont principalement stabilisées par HSP90. Le R2TP est chargé d'incorporer la protéine RPB1 nouvellement produite au sein de l'ARN Pol II dans le cytoplasme avant que le complexe ne soit importé dans le noyau (*Boulon, 2010*). Nos données récentes montrent qu'en absence de R2TP fonctionnel RPB1 s'accumule dans le cytoplasme de certaines cellules du tissu intestinal de souris où RPAP3 a été invalidé confirmant que le complexe co-chaperon R2TP est nécessaire pour l'assemblage de l'ARN Pol II dans les cellules en prolifération (*Maurizy, en révision chez Nat Commun, voir partie résultats*).

CHAPITRE 2 - Les voies de signalisation PI3K/mTOR

I. Organisation des complexes mTOR

La famille des PIKK (« *Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase* ») est connue comme une famille de protéine kinases Ser/Thr avec une séquence homologue au domaine catalytique des PI3-Kinase (Hunter, 1995). Tous les membres de cette famille sont de grosses protéines allant de 270 à 470kDa. Ils partagent deux domaines : un domaine catalytique hautement conservé, FATC (« *FRAP, ATM et TRRAP C-terminal* ») et des répétitions α -hélicoïdales successives dans la région N-terminale permettant les interactions protéine-protéine (**Figure 14 A**). Parmi les six PIKK, ATM, ATR, TRRAP et TOR sont conservées de *S. cerevisiae* à l'homme tandis que DNA-PKcs et SMG-1 sont apparues lors de l'évolution des métazoaires. Chaque PIKK forme un complexe protéique avec des partenaires spécifiques et chaque complexe PIKK jouent un rôle central dans les réponses cellulaires à divers stress comme les dommages à l'ADN ou à l'état métabolique de la cellule (**Figure 14 B**).

Au début des années 1970, un puissant anti-fongique a été extrait de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Il a été nommé rapamycine d'après le lieu de sa découverte (l'Île Rapa Nui) (Vezina C, 1975). Lors d'un crible chez la levure au début des années 1990, deux gènes cibles de la rapamycine ont été identifiés : TOR1 (« *Target Of Rapamycine 1* ») et TOR2 (« *Target Of Rapamycine 2* ») (Heitman, 1991). La protéine mTOR, aussi appelée FRAP (« *FKBP12-Rapamycine associated protein* »), est une kinase de sérine/thréonine (S/T) de 289 kDa (Chiu, 1994 ; Chen, 1994). Les protéines mTOR humaines et de levure partagent environ 40% d'identité de séquence (Wiederrecht, 1995). Chez le rat, la souris et l'homme, les protéines partagent une homologie de séquence de 95% (Hay and Sonenberg, 2004 ; Janus, 2005). Chez la souris, une délétion de mTOR est létale à l'état embryonnaire, montrant l'importance de la protéine pour le développement (Gangloff, 2004 ; Murakami, 2004). En terme de structure, la protéine mTOR est constituée de 2549 acides aminés. Elle contient en N-terminal un domaine de répétition HEAT (« *Huntingtin Elongation factor 3 (EF3), PR65/A subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), and TOR* ») (Gringas, 2001). En C-terminal, on retrouve un domaine kinase catalytique (KD), les domaines FAT et FATC ainsi qu'un domaine FRB (« *FKBP12-Rapamycin Binding Domain* ») permettant la liaison avec la protéine FKBP12 (Gringas, 2001 ; Perry and Kleckner, 2003) (**Figure 15**). La protéine mTOR va pouvoir s'intégrer dans deux complexes distincts mTORC1 et mTORC2 (« *mammalian Target Of Rapamycin Complex* »).

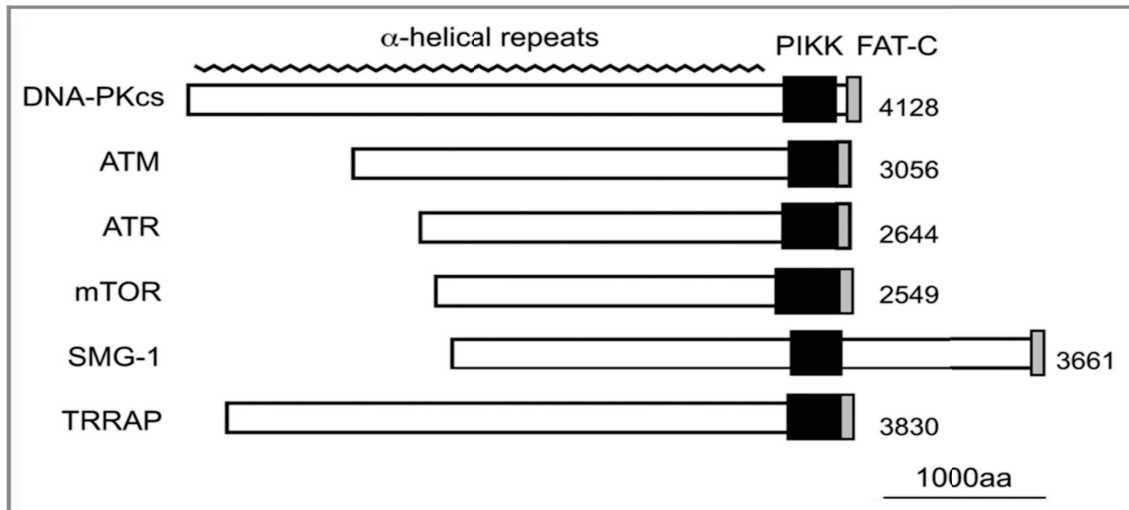
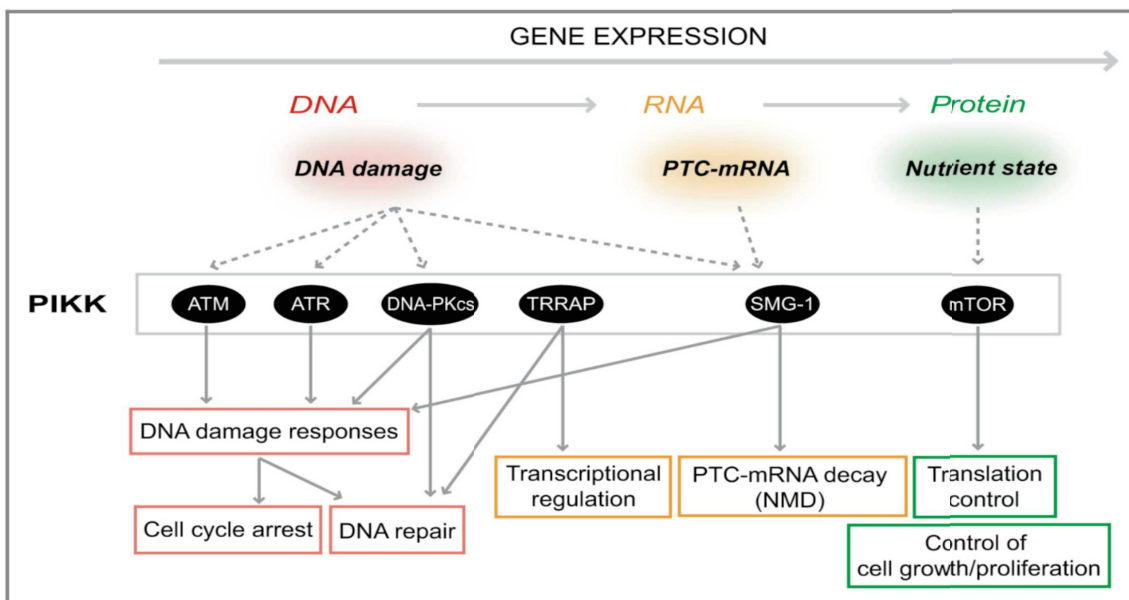
A**B**

Figure 14 : Structures des membres de la famille des PIKK et leurs fonctions cellulaires en condition de stress

(A) Domaines des membres de la famille PIKK chez l'homme. Les protéines partagent le domaine catalytique PIKK hautement conservé et le domaine FAT-C (« FRAP, ATM et TRRAP C-terminal »). Bien que le domaine PIKK ait une homologie de séquence avec le domaine catalytique des PI3K, les PIKK agissent comme des protéiques Ser/Thr kinases à l'exception du TRRAP. Le domaine FAT-C situé près du domaine PIKK est censé moduler l'activité kinase. La région N-terminal de PIKK est composée de répétitions α -hélicoïdales, qui contribuent aux interactions protéine-protéine.

(B) Réactions des PIKK après un stress cellulaire. Les PIKK sont activés par différents stress et induisent des réponses cellulaires appropriées à différentes étapes de l'expression des gènes. ATM et ATR sont activés par des dommages à l'ADN, y compris les cassures double brin (DSB), pour arrêter le cycle cellulaire et activer les voies de réparation de l'ADN. DNA-PKc s'engage dans le processus de réparation NHEJ. TRRAP régule la transcription dans le complexe HAT. SMG-1 reconnaît les ARNm ayant un codon STOP prématuré et conduit à leur dégradation. mTOR contrôle la traduction et la croissance cellulaire en réponse aux niveaux d'énergie de la cellule. À l'exception du TRRAP, chaque PIKK induit des réactions de stress appropriées par phosphorylations de protéines effectrices en aval.

Tiré de Izumi, 2012

Ces deux complexes régulent différentes voies de signalisation en fonction des signaux extracellulaires. De manière générale, la signalisation à partir des facteurs de croissance utilise la voie PI3K-AKT et régule mTORC1 pour stimuler la traduction. Une diminution en énergie ou l'épuisement des nutriments inhibent mTORC1 via la voie AMPK pour déclencher le processus d'autophagie. En revanche, mTORC2 est insensible aux nutriments ou aux niveaux énergétiques. Il phosphoryle AKT et d'autres protéines kinases régulant le cytosquelette d'actine et la survie cellulaire en réponse aux facteurs de croissance et aux hormones (*Russell, 2011*) (**Figure 15**). Les deux complexes mTOR existent dans le cytoplasme tout en occupant différents compartiments cellulaires. En fonction des niveaux d'énergie et de nutriments, mTORC1 va être recrutée aux lysosomes pour y être activée (*Sancak, 2010*). mTORC2 va quand à lui se localiser au niveau du réticulum endoplasmique (RE) afin de s'associer avec les ribosomes (*Boulbés, 2011 ; Zinzalla, 2011*).

L'activité de mTOR est régulée via la phosphorylation de site spécifiques. La sérine 2481 est un site d'auto-phosphorylation régulant l'activité intrinsèque de mTOR (*Foster, 2010 ; Soliman, 2010 ; Caron, 2010*). De plus, la phosphorylation des sérines 2446/2448 est à la fois PI3K/AKT dépendante et faite par la protéine S6K par une boucle de rétro-contrôle (*Chiang and Abraham, 2005*). La sérine 1261 dans le domaine HEAT est phosphorylée par la voie PI3K en fonction du niveau d'acides aminés dans la cellule.

A. mTORC1

Chez les mammifères, le complexe mTORC1 est sous forme homodimérique. Chaque monomère est composé de la kinase mTOR, de mLST8, de Deptor, de PRAS40 et de Raptor (*Yip, 2010 ; Peterson, 2009*). PRAS40 et Raptor sont des composants spécifiques du complexe mTORC1 alors que les autres sous-unités sont également présentes dans le complexe mTORC2. **Raptor** (« *regulatory associated protein of mTOR* ») est essentiel pour l'activité de mTORC1 en réponse aux niveaux d'insuline, d'énergie et de nutriments de la cellule car il va recruter les substrats (*Kim, 2002 ; Hara, 2002*). C'est également Raptor qui va servir de plateforme d'assemblage des sous-unités de mTORC1 via ses domaines HEAT et WD40. **PRAS40** (« *Prolin-Rich AKT substrate 40 kDa* ») régule négativement l'activité de mTORC1 (*Sancak, 2007*). C'est un substrat de la protéine AKT qui va le phosphoryler sur la thréonine 246 et ainsi lever l'inhibition de mTORC1 (*Kovacina, 2003*). **mLST8** (« *mammalian lethal with Sec13 protein 8* ») se compose de sept répétitions WD40 se liant au KD de mTOR (*Kim, 2003*). Enfin, **Deptor** (« *DEP domain TOR-binding Domain* ») va se lier à mTOR sur son domaine FAT et ainsi être retrouvé aussi bien dans les complexes mTORC1 que mTORC2 (*Peterson, 2009*).

La délétion totale d'un seul composant du complexe mTORC1 est létale à l'état embryonnaire :

mTOR (Murakami, 2004 ; Gangloff, 2004), mLST8, Raptor (Guertin, 2006). Le complexe mTORC1 est sensible à un traitement aigu de rapamycine à faible dose. La rapamycine se lie à FKBP12 et se lie à mTOR, inhibant par compétition l'interaction mTOR-Raptor mais aussi l'assemblage et l'activation du complexe mTORC1 (Murakami, 2004 ; Yip et al., 2010).

Régulation de la transcription

Le complexe mTORC1 est associé au facteur d'initiation de la traduction eIF4E (« *Eukaryotic translation initiation factor 4E* »), et à la protéine eIF4E-BP1 (« *EIF4E binding protein 1* »). Lors de l'activation de mTORC1, eIF4E-BP1 va être phosphorylé et ainsi libérer eIF4E pour qu'il initialise la traduction en recrutant les ribosomes (Richter and Sonenberg, 2005). mTORC1 phosphoryle également S6K entraînant une deuxième phosphorylation activatrice de S6K par la protéine PDK1 sur son site catalytique (Ma and Blenis, 2009). S6K activé va ensuite phosphoryler des protéines comme la protéine ribosomale S6, PDCD4 (« *Programmed Cell Death 4* »), eEF2K (« *eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase* »), CBP80 (« *Cap-Binding Protein 80* ») et eIF4B (« *eukaryotic Translation Initiation Factor 4B* »). Tous ces substrats vont participer à la synthèse protéique et à la biogénèse ribosomale (Ma and Blenis, 2009). Pour activer la biogénèse ribosomale, mTORC1 va également inhiber par phosphorylation la protéine PP2A (« *Protein Phosphatase 2A* ») afin de lever l'inhibition de TIF-IA (« *Transcriptional Initiation Factor IA* ») (Ma and Blenis, 2009).

Répression de l'autophagie

Lorsque la cellule a un niveau faible en nutriments, elle va activer les voies d'autophagie afin de dégrader des composants intracellulaires comme les protéines et recycler les acides-aminés et ainsi avoir un accès intra-cellulaire en nutriments (Egan, 2011). Ce processus intervient au niveau des lysosomes et est initié par un complexe protéique contenant la kinase ULK1 (« *unc-51-like kinase1* »), ATG13 (« *Mammalian autophagy-related gene 13* ») et FIP200 (« *Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa* »). La protéine AMPK (« *AMP-activated protein kinase* ») est un senseur des niveaux d'énergie et c'est elle qui active l'autophagie en phosphorylant ULK1 (Egan, 2011). mTORC1 va avoir l'effet inverse et inhiber l'autophagie en phosphorylant ATG13 et ULK1 (Ganley, 2009 ; Hosokawa, 2009 ; Jung, 2009 ; Mizushima, 2010).

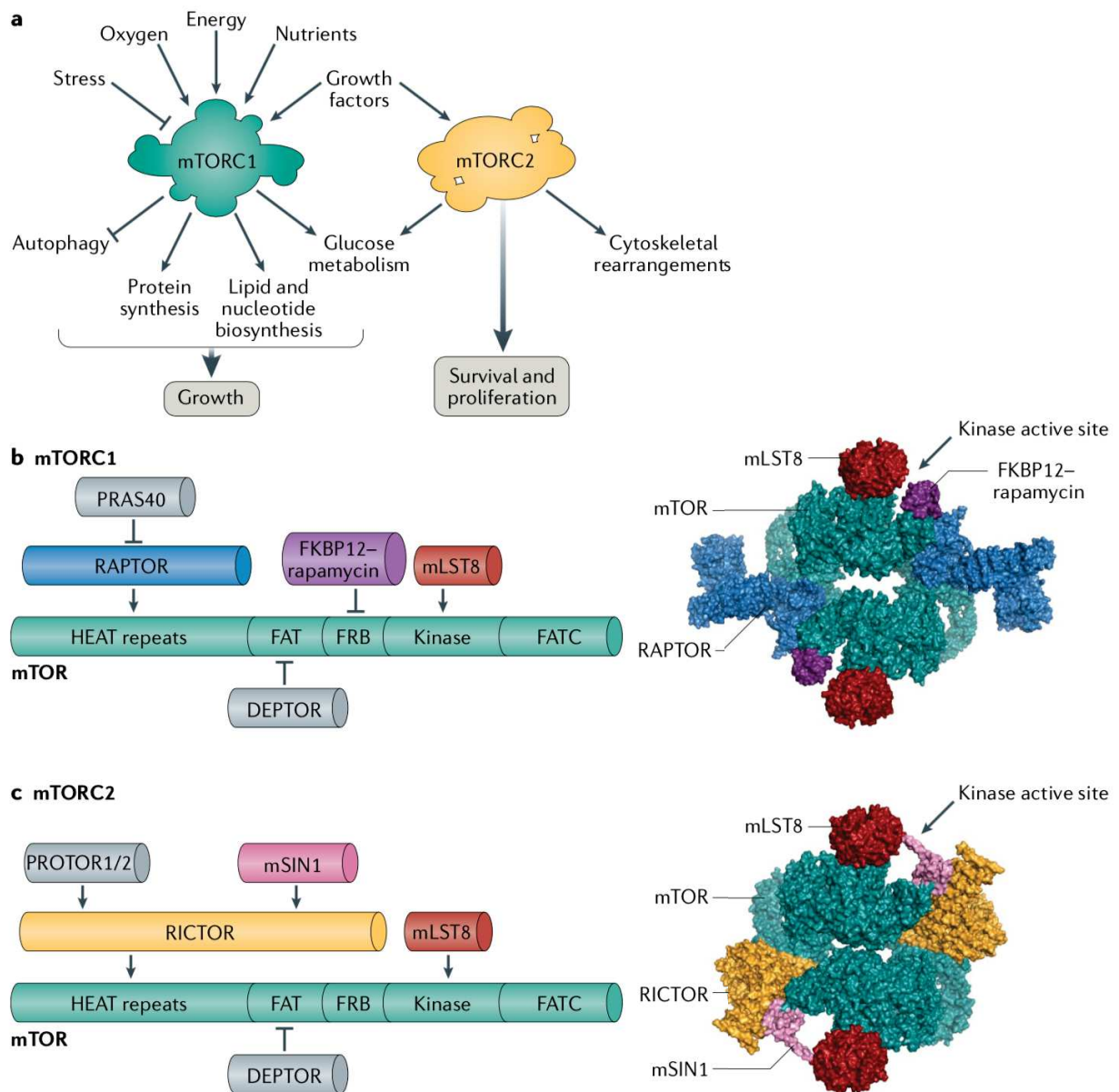


Figure 15 : Structure et fonction de mTORC1 et mTORC2.

(a) mTORC1 et mTORC2 ont des rôles de signalisation distincts dans la cellule. mTORC1 intègre des informations sur l'abondance nutritionnelle et le statut environnemental pour ajuster l'équilibre de l'anabolisme et du catabolisme dans la cellule, tandis que mTORC2 régit le comportement cytosquelettique et active plusieurs voies prolifératives. Contrairement au mTORC1, qui est fortement inhibé par la rapamycine, le mTORC2 ne répond qu'au traitement prolongé de la rapamycine.

(b) Composants de mTORC1 (gauche). mTOR (vert) contient des motifs HEAT répétés, suivis du domaine FAT, du domaine FRB, du domaine kinase catalytique et du domaine C-terminal FATC. Les protéines mLST8 (rouge) et DEPTOR (gris) vont se lier à mTOR au sein de mTORC1 et mTORC2. Raptor (bleu) se lie aux motifs HEAT de mTOR et recrute PRAS40 (gris). Une reconstruction à 5.9-Å de mTORC1 (droite) sans PRAS40 et DEPTOR en représentation de surface (PDB : 5FLC)

(c) Composants de mTORC2 (gauche). mTOR (vert) s'associe à mLST8, DEPTOR et RICTOR, la composante spécifique de mTORC2. RICTOR recrute la protéine PROTOR1/2 et la protéine mSIN1. Une reconstruction à 4.9-Å de mTORC2 (droite) (sans DEPTOR et PROTOR) en représentation de surface (PDB : 5ZCS).

Tiré de Liu et Sabatini, 2020

B. mTORC2

En 2004, un complexe mTORC2 est identifié. Comme mTORC1, il contient les protéines mTOR, mLST8 mais s'associe avec d'autres protéines telles que Rictor, mSin1, Protor1 et Protor2. (Sarbasov, 2004). Le complexe Rictor-mTOR identifié ne phosphoryle cependant pas les mêmes cibles que mTORC1. **Rictor** est la protéine ayant permis l'identification de mTORC2 (« *rapamycin-insensitive companion of mTOR* ») (Jacinto, 2004 ; Sarbasov, 2004). Rictor ne contient aucun domaine catalytique et pourtant sa déplétion entraîne une perte de la polymérisation de l'actine et de la motilité cellulaire, deux fonctions portées par mTORC2 (Sarbasov, 2004). La protéine **mSin1** (« *mammalian Stress-Activated Protein Kinase interacting protein 1* ») s'associe avec Rictor sur le complexe et ils vont se stabiliser de manière réciproque (Yang, 2006). L'absence de Sin1 chez *D. melanogaster* ou induite dans les cellules mammifères entraîne une forte baisse de la phosphorylation de AKT (S473) (Jacinto, 2006). De plus, mSin1 semble important pour l'assemblage du complexe mTORC2 puisque sa déplétion entraîne une baisse de l'interaction entre Rictor et mTOR (Vander Haar, 2007 ; Jacinto, 2006) ; Yang, 2006). Protor-1 et Protor-2 (aussi nommés Proline rich protein 5 (PRR5) (Pearce, 2007 ; Woo, 2007) et PRR5-like (PRR5L) (Thedieck, 2007) respectivement) sont deux protéines interagissant avec Rictor et mSin1 (Pearce, 2007). Leurs fonctions restent encore floues et elles ne semblent pas nécessaires à l'assemblage ou à l'activité de mTORC2 (Pearce, 2007).

Quand mTORC2 a été découvert, on a d'abord pensé qu'il était insensible à la rapamycine, d'où le nom de Rictor (Sarbasov, 2004). Cependant, il a été montré qu'une exposition prolongée à la rapamycine est capable d'inhiber aussi le complexe mTORC2. La rapamycine ne perturbe pas l'interaction Rictor-mTOR comme pour mTORC1 mais empêche l'assemblage du complexe mTORC2 en bloquant la protéine mTOR nouvellement synthétisée (Sarbasov, 2006). mTORC2 ne phosphoryle pas les mêmes cibles que mTORC1. Tout d'abord, il est nécessaire à la phosphorylation activatrice de AKT sur la sérine 473. La phosphorylation de la sérine 473 en plus de la thréonine 308 permet de l'activer complètement et augmente fortement son activité (Sarbasov, 2005). Cela permet de renforcer l'activation du complexe mTORC1. Cependant la phosphorylation de AKT dépendante de mTORC2 n'est pas nécessaire pour que cette dernière phosphoryle à son tour certains substrats comme GSK3, TSC2 ou mTORC1 (Jacinto, 2006). De plus, le complexe mTORC2 phosphoryle la kinase SGK1 (« *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1* ») qui régule le transport ionique et la survie cellulaire (Mori, 2014). mTORC2 phosphoryle également les membres de la famille des PKC impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (Jacinto, 2004 ; Gan, 2012 ; Thomanetz, 2013).

Comme pour mTORC1, la délétion totale d'un seul composant du complexe mTORC2 est létal à l'état embryonnaire : mTOR (Murakami, 2004 ; Gangloff, 2004), mLST8 (Guertin, 2006), Rictor

(Guertin, 2006 ; Shiota, 2006), sin1 (Jacinto, 2006 ; Yang, 2006). Les effets de la délétion sont dus à un défaut de signalisation de mTORC2 qui ne phosphoryle plus ses substrats (Lamming, 2012). Le complexe mTORC2 est donc impliqué dans le métabolisme, la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. Cependant, les mécanismes exacts de l'activation du complexe mTORC2 restent encore à élucider.

II. Le complexe TSC

A. Généralités

Les gènes TSC1 et TSC2 ont été identifiés dans les années 1990 car il s'agissait de gènes mutés dans la sclérose tubéreuse (« *Tuberous Sclerosis Complex* »)(Kandt, 1992 ; *European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium*, 1993 ; van Slegtenhorst, 1997). La sclérose tubéreuse est une maladie génétique caractérisée par le développement de nombreuses tumeurs bénignes (hamartomas) dans différents organes incluant le cerveau, le foie, les poumons, la peau et le cœur. Ces tumeurs bénignes entraînent des troubles neurologiques tels que l'épilepsie, l'autisme et le retard mental mais également des anomalies de la peau et des insuffisances rénales et pulmonaires. La sclérose tubéreuse est causée par des mutations dans les gènes TSC1 et TSC2 entraînant une perte de fonction. La prévalence de cette maladie est estimée à 1 pour 6000 individus (Crino, 2006).

Identification des sous-unités du complexe TSC

Un lien fonctionnel entre les protéines TSC1 et TSC2 a été établi dans des études démontrant que ces deux protéines étaient physiquement associées l'une à l'autre (Plank, 1998 ; van Slegtenhorst, 1998). TSC1 et TSC2 s'associent pour former un complexe hétérodimérique (Hodges, 2001). Ce complexe est également retrouvé avec des orthologues de la drosophile (Gao and Pan, 2001 ; Potter, 2001) et de la levure *S. pombe* (Matsumoto, 2002).

TBC1D7 (« *Tre2-Bub2-Cdc16 domain family member 7* ») est une petite protéine de la famille des protéines TBC dont le domaine TBC porte la fonction GAP (**Figure 16 A**) (Pan, 2006 ; Frasa, 2012). Cependant le domaine TBC de TBC1D7 ne contient pas les résidus nécessaires pour cette activité catalytique (Dibble, 2012 ; Frasa, 2012). TBC1D7 est également une protéine se liant à TSC1 récemment identifiée comme la troisième sous-unité du complexe TSC (Nakashima, 2007 ; Sato, 2010 ; Dibble, 2012). TSC1, TSC2 et TBC1D7 forment le noyau du complexe TSC dans la cellule (**Figure 16 B**). La déplétion de TBC1D7 entraîne une diminution de l'association de TSC1 avec TSC2 et donc la perte de l'inhibition de mTORC1 aboutissant à une augmentation de la croissance cellulaire et une inhibition de l'autophagie même dans des conditions de croissance

défavorable (Dibble, 2012). La sur-expression de TBC1D7 augmente également l'activité de mTORC1 (Nakashima, 2007). Aucune mutation dans le gène de TBC1D7 n'a été décelée chez des patients atteints de sclérose tubéreuse, mais la perte homozygote de la protéine entraîne une déficience intellectuelle et une mégacéphalie ainsi qu'un trouble du développement associé à l'activation de mTORC1 (Capo-Chichi, 2013). Dans le cancer du poumon, TSC1 stabilise TBC1D7 et favorise la tumorigenèse (Sato, 2010).

TSC1 contient un domaine N-terminal (NTER résidus 1 à 265) qui est important pour le repliement et la stabilité du TSC1 (Sun, 2013). Les mutations affectant ce domaine représentent la majorité des mutations TSC1 pathogènes. En plus du domaine NTER, TSC1 contient un grand domaine Coiled-Coil (résidus 725-988) permettant la dimérisation de la protéine en présence de TBC1D7 (**Figure 16 A**) (Hoogeveen-Westerveld, 2010 ; Qin, 2016). Le site de liaison à TBC1D7 est sur son CTER (résidu 939-977) dans le domaine Coiled-Coil (Santiago Lima, 2014). La liaison de TSC2 se fait via deux domaines de TSC1, un situé en NTER (résidus 302 à 430) et un deuxième (résidus 681 à 937) également dans le domaine Coiled-Coil (Santiago Lima, 2014)(**Figure 16 B**).

TSC2 porte un domaine GAP (« *GTPase activating protein* ») au niveau de sa région C-Terminale (Wienecke, 1995 ; Xiao, 1997) (**Figure 16 A**). Ce domaine GAP est similaire au domaine GAP des petites protéines G Rap1 et Rab5. Les premières recherches sur l'activité GTPase de TSC2 ont révélé que ce domaine avait une faible activité GAP *in vitro* en comparaison de Rap1 et Rab5 (Wienecke, 1995 ; Xiao, 1997). A noter que des mutations dans ce domaine sont observées à une certaine fréquence chez les patients atteints de sclérose tubéreuse (Maheshwar, 1997), et des expériences de culture cellulaire et de xénogreffe ont suggéré que ce domaine contient l'activité suppresseur de tumeurs de TSC2 (Jin, 1996). TSC2 est la sous-unité fonctionnelle du complexe mais TSC1 est nécessaire pour la stabiliser et prévenir sa dégradation par la voie de l'ubiquitine-protéasome (Benvenuto, 2000 ; Chong-Kopera, 2006). Les mutations de TSC1 ou TSC2 déstabilisent généralement le complexe entraînant la dégradation TSC2 (Hodges, 2001 ; Nellist, 2001). TSC1 et TSC2 ont des fonctions distinctes en dehors du complexe TSC1-TSC2 (Rosner, 2008 ; Neuman and Hanske, 2011 ; Thien, 2015). Ces fonctions ne seront pas développées dans la suite de cette thèse.

Le complexe TSC régule l'activité de mTORC1

Il est maintenant reconnu que la fonction principale du complexe TSC est d'inhiber l'activité de mTORC1. Des expériences sur des cellules de mammifères ont démontré que la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 par mTORC1 est inhibée par la sur-expression du complexe TSC (Manning, 2002 ; Inoki, 2002 ; Gao X, Nat Cell Biol, 2002). En absence de TSC fonctionnel, le complexe mTORC1 reste actif quelques soient les facteurs de croissance ou niveaux d'énergies (Goncharova, 2002 ;

Jaeschke, 2002 ; Tee, 2002 ; Kwiatkowski, 2002). On détecte également une forte activité de mTORC1 dans toutes les tumeurs humaines et de souris ainsi que dans les lignées cellulaires dérivées de tumeurs qui n'ont pas TSC1 ou TSC2 (*Goncharova, 2002 ; Kwiatkowski, 2002 ; Crino, 2004*). Dans les modèles murins de TSC, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine provoque à J4 et moins une apoptose des cellules tumorales (*Kenerson, 2002 ; El-Hashemite, 2003*), et le traitement prolongé par rapamycine bloque la formation de tumeurs et provoque une régression tumorale (*Lee, 2005 ; Messina, 2007*).

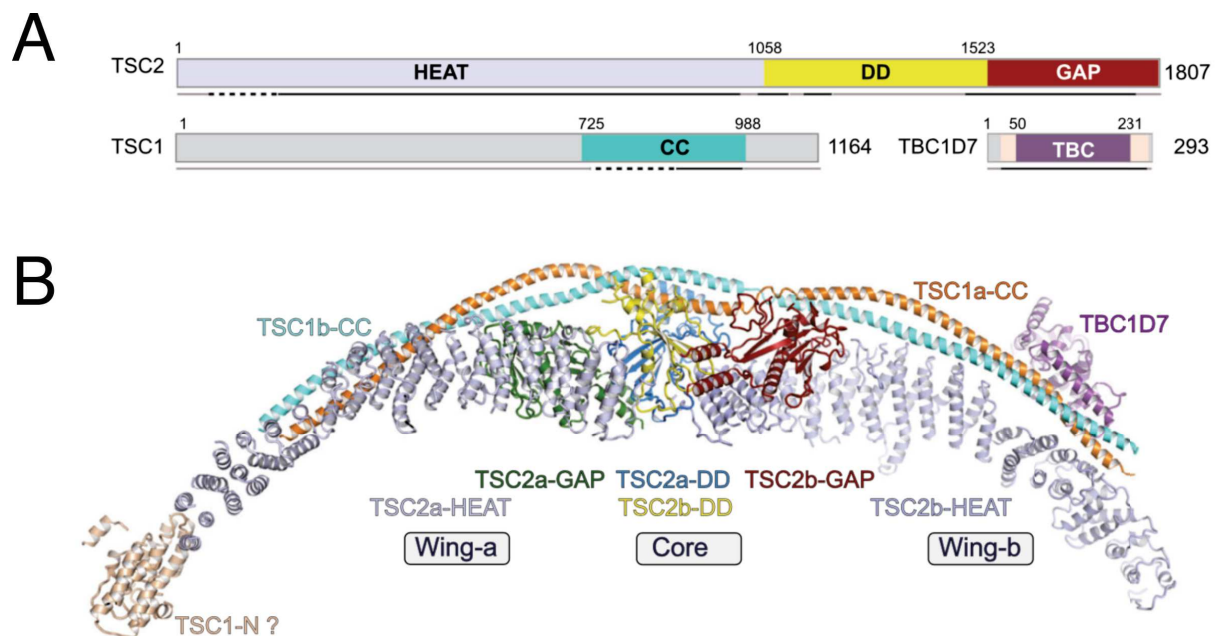


Figure 16 : Structure du complexe TSC chez l'homme.

(A) Structure des domaines des trois sous-unités repérés en couleur avec les régions invisibles colorées en gris. Le numéro des résidus aux limites des différents domaines est indiqué. HEAT: HEAT repeat domain, GAP: GTPase-activating domain, CC: coiled-coil, DD: dimerization domain, TBC Tre2-Bub2-Cdc16 domain. Les lignes grises en dessous indiquent les régions absentes de la structure en (B). Les lignes noires pleines et en pointillées ci-dessous indiquent les régions qui ont été modélisées avec des résidus et ou de la poly-alanine, respectivement.

(B) Représentation en ruban de la structure du complexe TSC. Les modules et les sous-unités sont annotés à côté.

Tiré de Yang, 2021

B. Rheb, la cliente de TSC2

Rheb (« *Ras Homolog Enriched in Brain* ») fait parti de la famille des petites protéines GTPase Ras. Il est conservé de la levure (*Urano, 2000*) jusqu'à l'homme (*Gromov, 1995*). Initialement, Rheb a été identifié comme un gène induit dans le cerveau lors de crises d'épilepsie ce qui lui a donné son nom, mais la protéine est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules (*Yamagata, 1994 ; Clark, 1997*). Rheb est une petite GTPase dont le cycle passe d'un état inactif lorsqu'elle est liée au GDP à un état actif quand liée à la GTP. Ce mécanisme fait de lui un modulateur des voies de transduction du signal de croissance cellulaire (*Yamagata, 1994 ; Gromov, 1995 ; Long, 2005*). Des études réalisées chez la levure ont permis d'identifier le rôle de Rheb dans la voie de réponse aux niveaux de nutriments (*Urano, 2000 ; Mach, 2000 ; Panepinto, 2002*). C'est chez la drosophile que le rôle de Rheb dans la croissance cellulaire sera révélé, en démontrant que la protéine augmentait la taille des cellules et des tissus (*Saucedo, 2003*).

Régulation de Rheb par le complexe TSC

L'activité des protéines Ras est régulée par deux types de protéines : les GEF (« *Guanine nucleotide Exchange Factors* ») et les GAP (« *GTPase-Activating Proteins* »). Les GEF favorisent la libération du GDP, facilitant ainsi la liaison du GTP. Une fois liée au GTP, la Ras GTPase active va interagir et activer ses protéines clientes. Les GAP vont accélérer l'hydrolyse du GTP entraînant l'inactivation de la GTPase et la dissociation du substrat (*Takai, 2001*). Rheb ne fonctionne pas comme toutes les protéines Ras puisqu'il reste associé au complexe mTORC1 qu'il soit actif ou inactif. Cependant Rheb doit être actif, donc lié au GTP, pour activer mTORC1 (*Long, 2005*). Pour le moment aucune protéine GEF de Rheb n'a été identifiée bien que TCTP (« *Translationally Controlled Tumor Protein* ») soit un candidat potentiel (*Hsu, 2007*). Il est difficile de confirmer cette hypothèse car, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, aucune activité GEF de TCTP n'induit de changement physiologique de Rheb (*Wang, 2008 ; Rehmann, 2008*). Chez la drosophile, dRheb induit une augmentation de l'activité mTOR et donc une augmentation de la taille des cellules (*Saucedo, 2003 ; Patel, 2003 ; Stocker, 2003*). De plus, la déplétion de dTSC1 ou dTSC2 induit une augmentation de la taille et de la prolifération des cellules (*Potter, 2001 ; Tapon, 2001*). D'autres études faites chez l'homme montrent que le complexe TSC inhibe Rheb à travers la fonction GAP de TSC2 (*Castro, 2003 ; Garami, 2003 ; Inoki, 2003 ; Tee, 2003 ; Zhang, 2003*), ce qui entraîne l'inhibition de mTORC1 et de la croissance cellulaire (**Figure 17 A**)(*Dibble, 2012*). Cette régulation de Rheb permet d'inhiber Rheb/mTORC1 en réponse à des stimuli inhibant la croissance cellulaire.

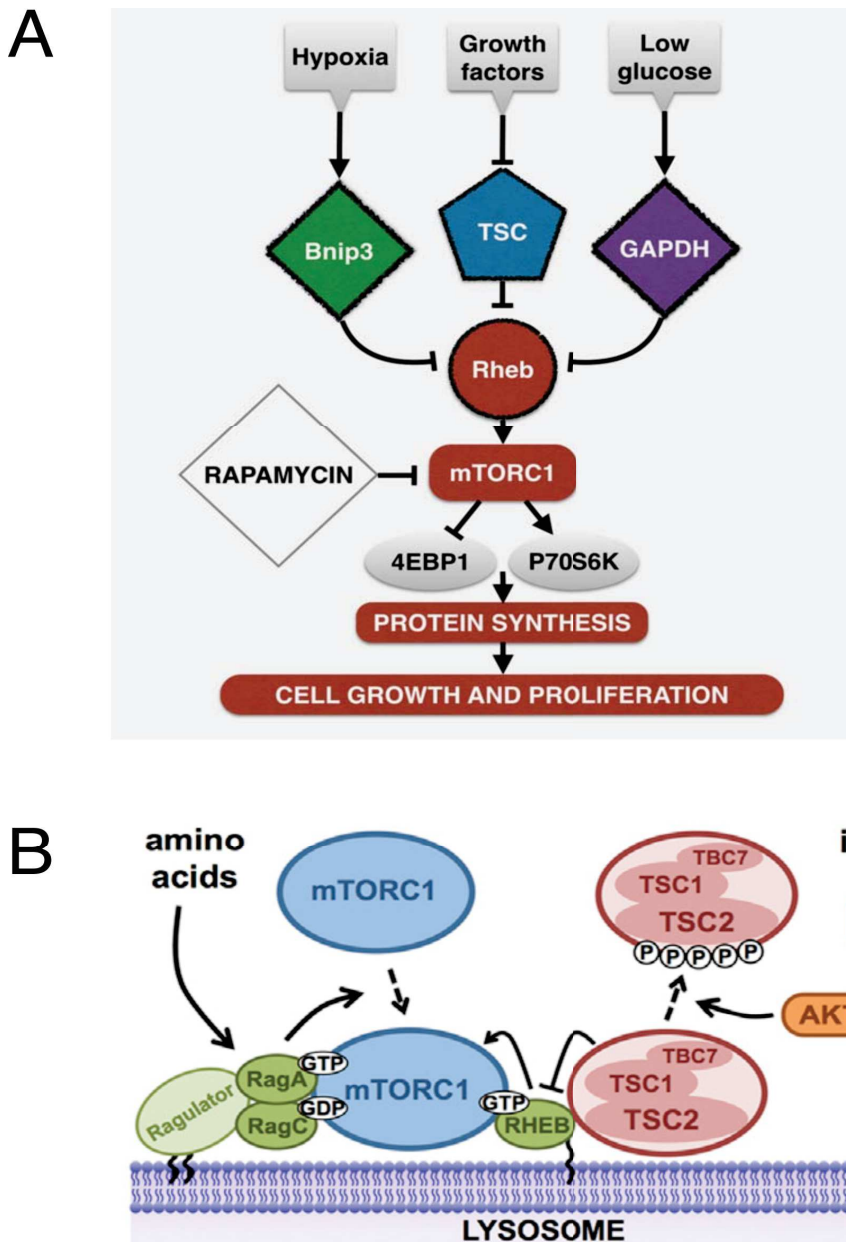


Figure 17 : Régulation de Rheb

(A) Schéma simplifié de régulation de Rheb/mTORC1 par les voies de signalisation en amont. L'activation de mTORC1 par Rheb lié au GTP entraîne l'inhibition de 4EBP1 et l'activation de p70S6K aboutissant à la régulation positive de la croissance et de la prolifération des cellules par stimulation de la synthèse des protéines. L'activité GAP de TSC2 inhibe Rheb et donc mTORC1 en réponse à des stimuli qui inhibent la croissance cellulaire. Les facteurs de croissance peuvent activer Rheb/mTORC1 en inhibant le complexe TSC. En condition hypoxie, Bnip3 interagit avec Rheb, diminuant les niveaux de Rheb lié au GTP nécessaires pour activer mTORC1. Lorsque les niveaux de glucose sont faibles, GAPDH interagit avec Rheb et prévient son interaction avec mTORC1. Le traitement à la rapamycine affecte la signalisation du Rheb/mTORC1 en inhibant l'activité de mTORC1.

Tiré de Armijo, 2016

(B) Modèle de la régulation spatiale du mTORC1 et du complexe TSC au lysosome.

Tiré de Menon, 2014

Régulation de Rheb indépendante du complexe TSC

Rheb interagit également avec Bnip3 (« *Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa protein- Interacting Protein 3* »), une protéine pro-apoptotique activée en condition d'hypoxie. L'interaction Rheb-Bnip3 entraîne l'hydrolyse du GTP et fait passer Rheb dans une forme inactive, inhibant ainsi mTORC1 dans des conditions d'hypoxie (**Figure 17 A**)(Li, 2007).

En réponse à une diminution des niveaux de glucose, la GAPDH (« *GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase* ») va interagir avec Rheb qu'il soit lié au GDP ou au GTP l'empêchant de se lier à mTORC1 et de l'activer (Lee, 2009). Lorsque les taux de glucose augmentent, la GAPDH se dissocie de Rheb, favorisant ainsi l'activation de mTORC1 (**Figure 17 A**)(Lee, 2009).

Une localisation intracellulaire importante pour l'activation de mTORC1

Rheb possède au niveau de son C-terminal (CTER) un motif CAAX (C : cystéine ; A : acide aminé aliphatique ; X : acide aminé du CTER) qui va subir des modifications post-traductionnelles telles que la farnésylation importante pour son ancrage aux membranes (Urano, 2000 ; Clark, 1997 ; Sancak, 2010 ; Buerger, 2006 ; Hanker, 2010). Chez la levure, l'absence de farnésylation sur Rheb induit l'arrêt du cycle cellulaire (Yang, 2001). Chez les mammifères cette modification post-traductionnelle est nécessaire à l'activation de mTORC1 (Castro, 2003 ; Tee, 2003). MCRS1 (« *microspherule protein 1* ») est responsable de l'ancrage de Rheb à la membrane lysosomale où mTORC1 va être pleinement actif (**Figure 17 B**)(Fawal, 2015). On retrouve également Rheb au niveau des membranes de peroxisomes où le complexe TSC inhibe mTORC1 en réponse au niveau de ROS (« *Reactive Oxygen Species* »)(Zhang, 2013). Les résidus cystéine des protéines Ras subissent une palmitoylation nécessaire pour leur localisation à la membrane plasmique (Apolloni, 2000). Il a été montré que l'absence de ces résidus cystéines dans la région hypervariable de Rheb entraîne une perte de la localisation à la membrane plasmique (Apolloni, 2000). Le contexte cellulaire semble également affecter la localisation de Rheb. L'appauvrissement en acides aminés réduit l'interaction de MCRS1 avec Rheb, entraînant une diminution de la localisation lysosomale de Rheb et, par conséquent, une réduction de l'activation de mTORC1 (Fawal, 2015).

C. Le complexe TSC, le senseur des signaux cellulaires

1. Réponse du complexe TSC aux facteurs de croissance

Voie PI3K/AKT

En réponse à l'insuline (et à l'IGF1), la voie PI3K/AKT active le complexe mTORC1 par deux mécanismes : la phosphorylation inhibitrice de PRAS40, protéine inhibitrice et composant de mTORC1, permettant l'activation de mTORC1 (*Sancak, 2007*) ; la phosphorylation du complexe TSC. TSC2 contient cinq sites reconnus par AKT et pouvant être phosphorylés. La sérine 939 et la thréonine 1462 ont été identifiées comme des cibles directes de AKT dans les cellules de mammifères et sont conservées chez la drosophile (**Figure 18 B**)(Ser 924 et Thr 1518 respectivement) (*Potter, 2002*). Une étude *in vivo* a montré que AKT pouvait également phosphoryler TSC2 sur les sérines 1130 et 1132 (*Inoki, 2002*). Enfin, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la sérine 981 était également un site de phosphorylation de AKT (*Inoki, 2002 ; Manning, 2002 ; Potter, 2002*). Ce dernier site est très similaire à la sérine 939 et est présent sur l'exon 25, qui peut être retiré par épissage alternatif. Il est possible que ce site soit une duplication d'une forme existante dans la protéine TSC2 de drosophile. En effet, les deux sérines (939 et 981) de la protéine humaine s'alignent avec la sérine 924 de la protéine de drosophile (**Figure 18 B**) (*Inoki, 2002*). La phosphorylation des sérines 939 et 981 sur TSC2 crée un site de liaison pour la protéine 14-3-3 (*Cai, 2006*) avec en plus la sérine 1462 (*DeYoung, 2008*). On retrouve également ce site de liaison sur plusieurs autres substrats de AKT (*Manning and Cantley, 2007*). Il est donc probable que 14-3-3 inhibe l'activité de TSC2 via la phosphorylation de AKT. Des études utilisant 14-3-3 comme appât montrent qu'il se lie à TSC2 mais aussi à TSC1 et que 14-3-3 n'influence pas la formation du complexe TSC (*Nellist, 2002 ; Shumway SD, J Biol Chem, 2003*).

Voie ERK/RSK (« *Extracellular signal Regulated Kinase / p90 Ribosomal protein S6 Kinase* »)

La voie de signalisation ERK peut également stimuler l'activité de mTORC1 en phosphorylant le complexe TSC1–TSC2 par la kinase RSK, également connue sous le nom de MAPKAP kinase 1 (« *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 1* ») (*Tee, 2003 ; Roux PP, Proc Natl Acad Sci USA, 2004*). Il a été montré que RSK phosphoryle la sérine 1798 de TSC2 et dans une moindre mesure les deux sites reconnus par AKT (Ser939 et Thr1462) (*Roux PP, Proc Natl Acad Sci USA, 2004*). Les sérines 664 et 540 ont été identifiées comme des sites directs phosphorylés par ERK (**Figure 18 B**) (*Ma L, Cell, 2005*). Ils semblent contribuer à l'activation de mTORC1 par la voie ERK (*Ma L, Cell, 2005*). Contrairement aux phosphorylations de AKT, ces deux phosphorylations par ERK perturbent l'association de TSC2 avec son partenaire TSC1 (*Ma L, Cell, 2005*). Collectivement, ces données suggèrent que la signalisation ERK, via RSK et ERK, active

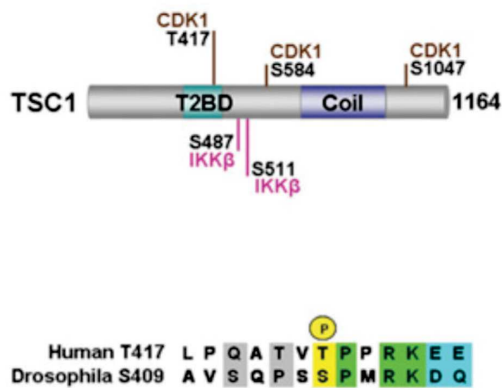
mTORC1 en inhibant TSC2 par plusieurs phosphorylations. TSC2 est également phosphorylée sur sa sérine 1254 par la MAPKAP kinase-2, qui est activé par p38 (**Figure 18 B**)(*Li, 2003*). Il n'est cependant pas clair si ce site de phosphorylation est reconnu par la protéine 14-3-3 car certaines études montrent une interaction (*Li, 2003*) quand d'autres ne parviennent pas à l'observer (*Cai, 2006 ; DeYoung, 2008*). Il n'est pas non plus clair si cette phosphorylation affecte l'intégrité du complexe TSC et inhibe sa fonction.

Cytokines et régulateurs du cycle cellulaire

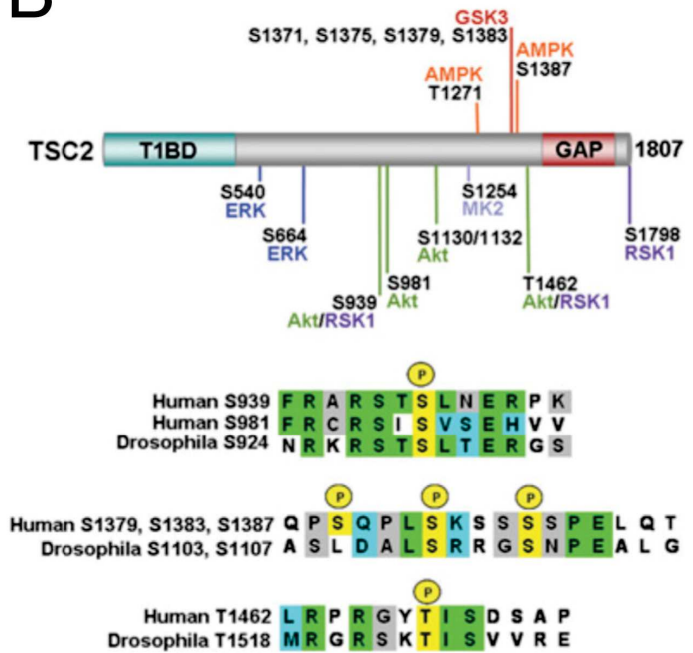
La cytokine pro-inflammatoire TNF α (« *Tumor Necrosis Factor α* ») active la voie mTORC1 grâce à la phosphorylation de TSC1 par IKK β (**Figure 18 A**)(« *inhibitory κ B kinase β* ») (*Lee, 2007*). IKK β s'associe avec TSC1 et phosphoryle les sérines 487 et 511. La sérine 511 est un site typique de phosphorylation de IKK β et est conservé parmi les orthologues de TSC1 chez les vertébrés. La sérine 487 est un site non canonique retrouvé uniquement chez les mammifères. Les résultats suggèrent des effets minimes sur la stabilité du complexe TSC, et le mécanisme précis d'inhibition de complexe par phosphorylation de ces sites n'est pas connu.

Au cours du cycle cellulaire, il a été proposé que les CDK (« *Cyclin-Dependent Kinases* ») pourraient jouer un rôle dans la régulation du complexe TSC. Pour tester cette hypothèse, des cellules humaines ont été traitées au nocodazole afin d'arrêter les cellules en phase G2/M. Cet arrêt du cycle cellulaire a entraîné une augmentation de la phosphorylation de TSC1 par CDK1 (*Astrinidis, 2003*). Trois sites reconnus par CDK1 sont présents sur la protéine TSC1 humaine (**Figure 18 A**)(Thr417, Ser584 et Thr1047) et semblent être la cible de cette phosphorylation. La sur-expression de TSC1, mutée au niveau de ces sites, inhibe un peu plus mTORC1 que la protéine endogène. Ceci suggère que la phosphorylation inhibe le complexe TSC. Cependant, le mécanisme moléculaire d'une telle inhibition n'est pas encore connu. De plus, il a été montré dans des études de sur-expression que la cycline D s'associe à TSC2 (*Zacharek, 2005*). La sur-expression de CDK6-cycline D augmente la phosphorylation de TSC1 et TSC2 mais les sites de phosphorylation et le fait que cela puisse impliquer d'autres enzymes n'est pas défini.

A



B



C

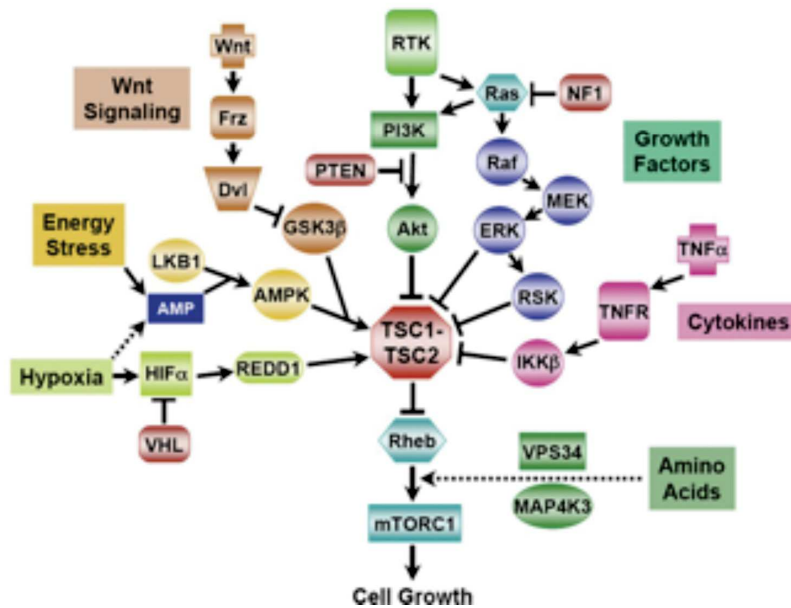


Figure 18 : Régulation du complexe TSC et intégration des signaux cellulaires

(A) Phosphorylation de TSC1 à des résidus spécifiques par différentes protéines kinases. Seul le site Thr417 est conservé entre l'homme et la Drosophile TSC1. Le site de phosphorylation est en jaune, les résidus identiques sont en vert, les résidus fortement semblables en bleu et les résidus semi-conservés en gris.

(B) Même chose que ci-dessus, mais pour TSC2. Il est à noter que les sites AMPK/GSK3 de Drosophile (Ser1107/Ser1103) ne se trouvent pas dans la même région de la séquence primaire que chez l'homme.

(C) Intégration des signaux cellulaires par le complexe TSC. Le complexe TSC surveille les conditions de croissance par de multiples voies de signalisation, qui inhibent ou activent le complexe pour affecter l'activité mTORC1.

Abréviations : Dvl, dishevelled; Frz, frizzled; MEK, MAPK/ERK kinase; TNFR, tumour-necrosis-factor receptor; VHL, von Hippel–Lindau tumour suppressor; VPS34, vacuolar protein sorting 34.

Tiré de Huang et Manning, 2008

2. Réponses du complexe TSC aux niveaux d'énergie et d'oxygène

Réponse aux variations d'énergie cellulaire

La synthèse protéique nécessite un apport suffisant en acides aminés mais aussi des niveaux d'énergie suffisants notamment des niveaux d'ATP car mTORC1 est très sensible à la baisse d'énergie cellulaire (Dennis, 2001). En condition de stress énergétique, les niveaux intracellulaires d'AMP vont augmenter activant l'AMPK (« AMP-dependent protein Kinase ») (Hardie, 2005). Une fois active, la kinase va augmenter les processus cataboliques producteurs d'énergie et diminuer les processus anabolisants qui consomment l'énergie, comme la synthèse des protéines. L'AMPK phosphoryle TSC2 sur la sérine 1387 et la thréonine 1271 (**Figure 18 B**), ce qui va activer sa fonction GAP pour inhiber Rheg et bloquer l'activation de mTORC1 (Inoki, 2003 ; Shaw, 2004). Il a été démontré que des mutants TSC2, ne pouvant plus être phosphorylés sur ces sites, empêchent les agents inducteurs de stress énergétique d'inhiber mTORC1 (Inoki, 2003). L'AMPK inhibe donc mTORC1 dans ces mauvaises conditions de croissance par la phosphorylation activatrice de TSC2 (**Figure 18 C**). GSK3- β (« Glycogen Synthase Kinase 3 β ») phosphoryle TSC2 sur les sérines 1371, 1375, 1379 et 1383 contribuant à l'activation du complexe TSC et à l'inhibition de mTORC1 dans des conditions d'épuisement énergétique (**Figure 18 B et C**). Wnt est un régulateur majeur de la croissance cellulaire, de la prolifération, de la polarité, de la différenciation et du développement. La GSK3- β active par phosphorylation l'activité de TSC2 afin d'inhiber l'activité de mTORC1 (Inoki, 2006). La voie Wnt inhibe GSK3- β aboutissant à la réactivation de la voie mTORC1 même en absence d'énergie surmontant les effets d'activation médiés par AMPK sur le complexe TSC (**Figure 18 C**) (Inoki, 2006). L'AMPK peut également réguler directement mTORC1 en phosphorylant Raptor et induire l'inhibition de mTORC1 (Gwinn, 2008).

Réponse au niveau d'oxygène cellulaire

L'hypoxie bloque la signalisation mTORC1 à travers deux mécanismes régulant tous deux le complexe TSC. La production d'ATP à travers l'oxydation mitochondriale se fait en condition aérobie et l'hypoxie va provoquer un stress énergétique activant l'AMPK (Liu L, 2006). Cependant, d'autres facteurs vont venir réguler mTORC1 en condition d'hypoxie tel que REDD1 (**Figure 18 C**). Deux orthologues de REDD1 chez la drosophile, *scylla* et *charybdis* inhibent la sur-croissance causée par l'activation d'AKT (Reiling, 2004). Des études sur des cellules de mammifères ont également montré que l'induction de REDD1 dans des conditions d'hypoxie était nécessaire pour diminuer l'activation de mTORC1 démontrant que ce mode de régulation était conservé (Brugarolas, 2004). La protéine REDD1 a été identifiée en interaction avec la protéine 14-3-3

(DeYoung, 2008). Ces données suggèrent que REDD1 inhibe mTORC1 en réactivant le complexe TSC inhibé par AKT. Le mécanisme proposé implique une première étape de phosphorylation de TSC2 par AKT (sur la sérine 939 et thréonine 1462) pour que la protéine 14-3-3 vienne se fixer avant que REDD1 ne s'associe à son tour à cette dernière et la dissocie du complexe TSC qui va pouvoir être à nouveau actif.

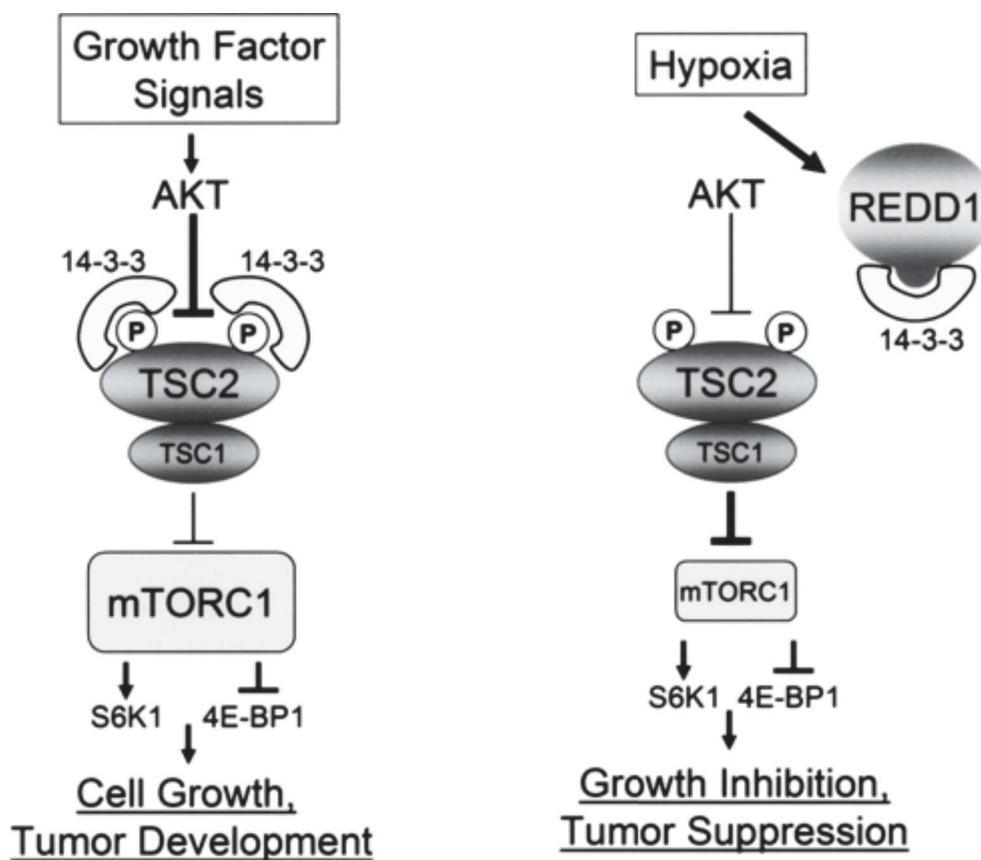


Figure 19 : Model de la régulation de l'activité de mTORC1 et de la croissance cellulaire par REDD1.

L'insuline et d'autres facteurs de croissance activent mTORC1 à travers la phosphorylation de TSC2 par AKT. Cette phosphorylation favorise l'association TSC2/14-3-3 et inhibe ainsi la fonction du complexe TSC. En réponse à l'hypoxie, REDD1 est induit et se lie à 14-3-3, ce qui entraîne la dissociation TSC2/14-3-3, l'activation du complexe TSC et l'inhibition de mTORC1. REDD1 peut inhiber mTORC1 même en présence d'une activation constitutive d'AKT. Par conséquent, la perte de REDD1 dans ce contexte induit une autre activation mTORC1 qui entraîne une tumeur.

Tiré de DeYoung, 2008

III. Activation de mTORC1 au niveau des lysosomes

Les lysosomes sont des organelles des cellules eucaryotes responsables de la dégradation des protéines, des polysaccharides et des lipides complexes qui peuvent ensuite être recyclés (Settembre, 2013 ; de Duve, 2005). Le processus catabolique des lysosomes est essentiel au maintien de l'homéostasie métabolique et cellulaire (Conner and Schmid, 2003 ; Di Fiore and von Zastrow, 2014 ; Kaur and Debnath, 2015 ; Mizushima and Komatsu, 2011). Il a été montré que la localisation de mTORC1 sur des vésicules ayant également Rab7 et LAMP2 (« *Lysosome-associated membrane protein 2* »), deux protéines lysosomales, était nécessaire à l'activation du complexe mTORC1 (Sancak, 2010 ; Sancak, 2008). La localisation de mTORC1 aux lysosomes dépend d'un groupe de quatre petites GTPases appelé Rag GTPases et d'un complexe pentamérique appelé Ragulator.

Les Rag GTPases forment un hétérodimère (A ou B avec C ou D) où la conformation active est constituée de RagA/B liés GTP avec RagC/D liés au GDP. Dans cette conformation, les Rag GTPases vont se lier à Raptor et séquestrer mTORC1 à la membrane lysosomale (Sancak, 2010 ; Kim, 2008 ; Sancak, 2008). La disponibilité cellulaire en acides aminés et en glucose va activer les Rag GTPases et permettre la localisation de mTORC1 au lysosome (Sancak, 2010 ; Kim, 2008 ; Bar-Peled, 2013). Ce rôle régulateur des Rag GTPases est conservé chez les souris (Efeyan A, Dev Cell, 2014), les mouches (Kim, 2008) et les levures (Dubouloz F, Mol Cell, 2005). En effet, dans les cellules de mammifères et de drosophiles, la sur-expression de mutants de RagA ou RagB fixés au GTP rend le mTORC1 constitutivement actif et insensible à l'élimination des acides aminés (Sancak, 2010 ; Kim, 2008). Les hétéro-dimères de Rag GTPase possèdent des protéines GEF et GAP spécifiques leur permettant d'adopter la bonne conformation pour répondre aux besoins de la cellule (Bar-Peled, 2013 ; Kim, 2012 ; Jin, 2015).

Le complexe multi-protéine Ragulator ou LAMTOR (« *late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 1* »), est responsable de la régulation de l'état de liaison nucléotidique des Rag GTPases et de leur localisation puisque les protéines de Rag ne contiennent pas de modifications lipidiques pour les ancrer à la membrane lysosomale (Sancak, 2010 ; Bar-Peled and Sabatini, 2012). Le complexe Ragulator comprend p18 (codé par LAMTOR1), p14 (codé par LAMTOR2), MP1 (« *MEK-binding Protein 1* » codé par LAMTOR3), C7orf59 (codé par LAMTOR4) et HBXIP (« *hepatitis B virus X-interacting protein* », codée par LAMTOR5). LAMTOR1 va ancrer les Rag GTPases et les deux hétérodimères LAMTOR2/LAMTOR3 et LAMTOR4/LAMTOR5 à la surface lysosomale via des modifications lipidiques (Nada, 2009). La déplétion des composants de Ragulator perturbe les Rag GTPases et empêche la liaison de mTOR à la surface des lysosomes (Sancak, 2010 ; Bar-Peled and Sabatini, 2012). Ragulator agit également comme un GEF pour RagA/B mais pas pour RagC/D ou d'autres GTPases (Bar-Peled and

Sabatini, 2012).

Rheb est ancré sur le lysosome grâce à son motif CAAX. Le recrutement de mTORC1 au lysosome est donc nécessaire à son activation (*Sato, 2009*). La structure du complexe Rheb-mTORC1 par microscopie cryo-électronique a permis de mieux comprendre le mécanisme d'activation de mTORC1 par Rheb (*Yang, 2017*). Rheb va changer la conformation de mTORC1 pour aligner les résidus du sites catalytique (*Yang, 2017*). Le complexe TSC va venir réguler Rheb en favorisant l'hydrolyse du GTP, dissociant ainsi Rheb de mTORC1 (*Caroll, 2016*). Un large éventail de stimuli cellulaire en amont régule à son tour le complexe TSC. Les facteurs de croissance (via PI3K/Akt), l'état énergétique (via AMPK), l'hypoxie (via REDD1) ou les dommages à l'ADN régulent tous l'interaction du complexe TSC avec Rheb sur le lysosome (*Demetriades, 2016*).

En conclusion, l'activation de mTORC1 nécessite deux conditions : le recrutement du complexe à la surface lysosomale stimulé par les nutriments et les Rag GTPases et son activation après sa liaison à Rheb-GTP régulée par le métabolisme, la disponibilité de nutriments, d'énergie et d'oxygène cellulaire. Ainsi, en fournissant une plate-forme pour les protéines Rags et Rheb, le lysosome crée un centre de signalisation qui contrôle étroitement l'activité mTORC1 et ainsi la croissance cellulaire et l'homéostasie.

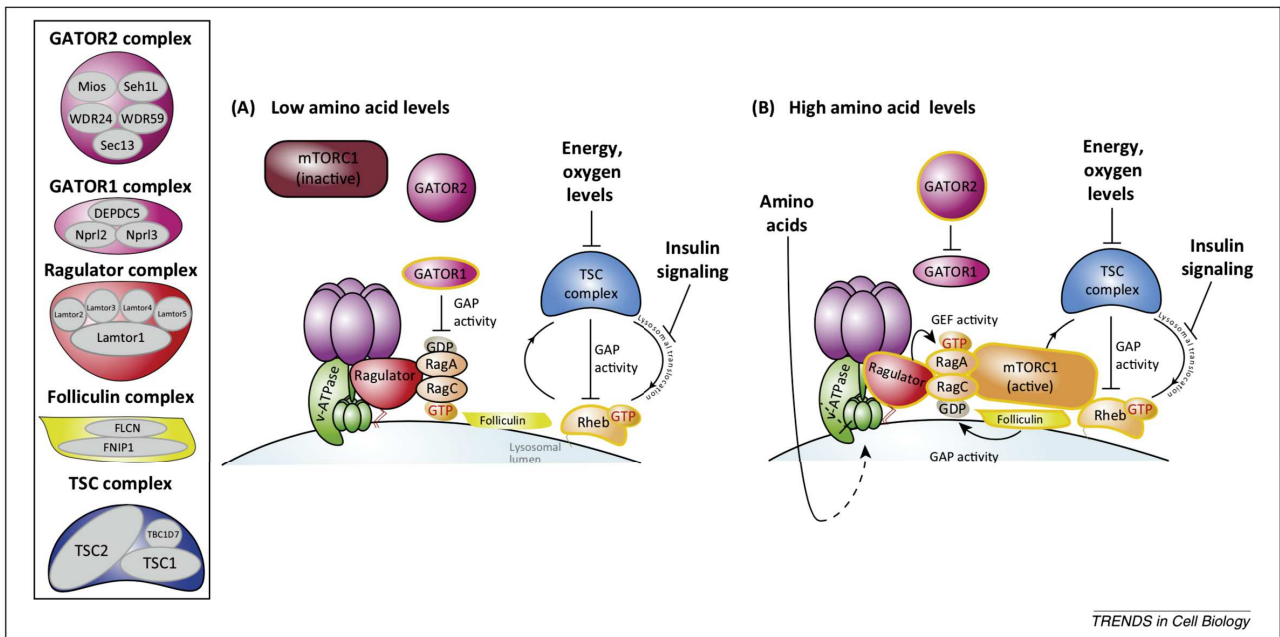


Figure 20 : Régulation de la localisation et de l'activation de mTORC1.

(A) Dans des conditions de faible teneur en acides aminés, Ragulator se trouve dans un état inhibiteur avec la protéine v-ATPase, et GATOR1 exerce son activité GAP en maintenant RagA dans un état inactif lié au GDP ce qui empêche mTORC1 d'être recruté au lysosome. L'insuline inhibe la translocation du TSC à la surface lysosomique où elle fonctionne comme un GAP pour le Rheb.

(B) Lors de la stimulation des acides aminés, GATOR1 peut être inhibé par GATOR2, et Ragulator et v-ATPase subissent un changement conformationnel, déclenchant l'activité GEF de Ragulator sur RagA, tandis que le complexe folliculine favorise l'hydrolyse du GTP sur RagC. L'hétéro-dimère désormais actif, composé de RagA-GTP et de RagC-GDP, recrute mTORC1 à la surface lysosomique où il interagit avec et est activé par Rheb.

Tiré de Bar-Peled and Sabatini, 2014

CHAPITRE 3 - Implications du PAQosome et de la voie mTOR dans les cancers

I. HSP et échappement tumoral

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. Le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé estime en 2018 à 18,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancers et à 9,6 millions le nombre de décès par cancers (*Bray, 2018*). Tous sexes confondus, le cancer du poumon est le cancer le plus souvent diagnostiqué (11,6 % du nombre total de cas) suivi de près par le cancer du sein (11,6 %), le cancer de la prostate (7,1 %) et le cancer colorectal (6,1 %). En termes de mortalité, le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer (18,4 % du nombre total de décès par cancer), vient ensuite le cancer colorectal (9,2 %), le cancer de l'estomac (8,2 %) et le cancer du foie (8,2 %). Au cours des dernières décennies, la thérapie chirurgicale, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie ont connu un fort développement. Toutefois, l'effet bénéfique des traitements est toujours limité en raison des changements génétiques et biochimiques induits par le traitement qui confèrent une résistance à celui-ci (*Sauvage, 2017*). Par conséquent, il est de plus en plus nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de découvrir de nouvelles cibles moléculaires pour un traitement efficace du cancer.

A. Rôle de HSP90 dans la cancérogenèse

La tumorigenèse chez l'homme est un processus qui combine altérations cellulaires et génétiques conduisant à la transformation progressive de cellules normales en dérivés malins. Les cellules tumorales possèdent un génome altéré par des mutations ponctuelles ou des réarrangements chromosomiques. Ces changements génétiques leur confèrent plusieurs avantages : une capacité de prolifération rapide même en absence de stimuli extra-cellulaire ; échappement du programme de mort cellulaire par apoptose ou encore réplication illimitée. Mais ces avantages entraînent le développement d'un micro-environnement extracellulaire défavorable. Dans une tumeur, les cellules cancéreuses se développent rapidement. Elles consomment une grande quantité de nutriments et d'oxygène et produisent également une grande quantité de déchets métaboliques réduisant ainsi le pH de l'environnement. Les protéines de choc thermique ont été identifiées à l'origine comme des protéines dont l'expression est nettement améliorée dans des conditions stressantes (*Miyata, 2013*). Dans de nombreux types de cancer, la cellule cancéreuse s'adapte donc en augmentant l'expression des chaperons. Elles empêchent ainsi le mauvais repliement et

l'agrégation des protéines, ce qui entraînerait à terme la mort cellulaire (*Calderwood, 2006*). Par conséquent, les inhibiteurs de chaperon se sont révélés extrêmement prometteurs en tant qu'agents chimio-thérapeutiques.

Les HSP sont des protéines qui fonctionnent pour maintenir l'homéostasie cellulaire en réponse à des facteurs de stress tels que l'hypoxie, l'anoxie, la température élevée, les médicaments et d'autres agents chimiques qui induisent la dénaturation des protéines (*Ghane Shahrbaaf et Assidi, 2015*). Ils facilitent le repliement des protéines et maintiennent des structures protéiques qui régulent les métabolismes cellulaires essentiels à la survie et à la prolifération des cellules. Les cellules cancéreuses détournent les rôles protecteurs des HSP pendant la cancérogenèse (*Ghane Shahrbaaf et Assidi, 2015*). HSP90 est la famille de HSP la plus étudiée pour ses nombreuses implications dans le développement du cancer. Elle inhibe l'apoptose cellulaire et joue un rôle important dans le repliement, la stabilisation, l'activation et la dégradation des protéines dans de multiples cancers (*Schopf, 2017*). De nombreuses études ont rapporté que HSP90 est souvent surexprimé et associé à un mauvais pronostic dans de multiples tumeurs, y compris les cancers du poumon, de l'estomac, du sein et le glioblastome (*Patel, 2014 ; Shirota, 2015 ; Saini and Sharma, 2018 ; Sartori, 2017*).

L'expression accrue de HSP90 favorise la cancérogenèse de par sa régulation du repliement, de la stabilité et de la maturation de nombreuses protéines oncogènes. HSP90 stabilise la forme mutée de p53, qui supprime l'arrêt de croissance et l'apoptose en réponse à des facteurs de stress cellulaires tels que les dommages à l'ADN (*Wiech, 2012*). L'expression plus forte de HSP90 entraîne également l'activation des protéines kinases oncogènes comme JAK2/STAT3, PI3K/AKT et MAPK, et facilitent le développement des cellules cancéreuses (*He, 2014*). En outre, HSP90 active HIF-1 α et NF-kB, qui ensemble, augmentent l'apparition d'événements oncogéniques tels que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules cancéreuses, l'invasion et la motilité qui aboutissent à l'apparition de métastases (*Nagaraju, 2015*).

B. Inhibition de HSP90

L'expression de HSP90 est de deux à dix fois plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules normales (*Ferrarini, 1992*). HSP90 est déjà une protéine très abondante dans les cellules normales et elle est essentielle. Les kinases et les récepteurs des facteurs de croissance constituent une classe importante de clients de HSP90. Comme les voies de signalisation et de croissance cellulaire qui impliquent ces kinases et ces récepteurs sont souvent sur-activées dans les cancers, il va être intéressant de les inhiber via l'inhibition de HSP90 qui va entraîner leur dégradation (*Moser, 2009*). Cependant, HSP90 possède de nombreuses protéines clientes, et son inhibition peut entraîner des effets pléiotropiques non désirés. HSP90 est assistée par plusieurs co-chaperons qui régulent

son cycle ATPase et qui médient aussi la reconnaissance de ses substrats. Ainsi, cibler ces co-chaperons pourrait permettre de restreindre l'inhibition de HSP90 à un type de clients bien déterminé. Le système HSP90/R2TP est connu pour assembler des régulateurs de la prolifération cellulaire comme mTOR (*von Morgen, 2015*) et d'autres complexes impliqués dans l'expression des gènes comme les ARN polymérases (*Boulon, 2010*) et les snoRNP impliqués dans la synthèse des ribosomes (*Bizarro, 2014*). L'ensemble des complexes cibles sont impliqués dans des mécanismes de prolifération et de croissance cellulaire ou dans la réparation de l'ADN. Le système HSP90/R2TP n'est pas encore complètement caractérisé et nous recherchons l'ensemble de ses clients. Caractériser tous les co-facteurs du R2TP et tous les substrats du système HSP90/R2TP pourrait dévoiler de nouvelles cibles dans des traitements combinatoires avec les inhibiteurs de HSP90 générant un effet synthétique létal qui seraient plus spécifiques aux cellules cancéreuses. L'instabilité génétique des cellules tumorales favorise l'apparition de résistance aux traitements. L'inhibition de HSP90 et/ou de certains co-chaperons spécifiques pourrait contrecarrer l'apparition de ces résistances.

De nombreux inhibiteurs naturels et synthétiques du HSP90 ont été mis au point ces dernières années, dont certains présentent d'excellentes activités anti-tumorales et ont été soumis à des essais cliniques (*Trepel, 2010 ; Neckers and Workman, 2012*). En voici quelques-uns :

- Le ganetespib, un inhibiteur synthétique HSP90 de deuxième génération, a montré des effets anti-tumoraux prometteurs avec des profils d'innocuité. Il est en cours de développement au sein d'essais cliniques dans le traitement des cancers prédisposés aux métastases et résistants aux médicaments comme les cancers thyroïdien, ovarien, mammaire et du poumon (*Lin, 2017 ; Kurihara, 2019 ; Mumin, 2019*). Le ganetespib inhibe efficacement la progression du cancer en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire G2/M par inhibition des voies RAS/RAF/ERK et PI3K/AKT/mTOR et en favorisant l'apoptose par la caspase-3 (*Lin, 2017 ; Lee, 2017*).
- Un autre inhibiteur de HSP90, le NVP-AUY922, est un nouvel amide d'isoxazole résorcinylique qui diminue la viabilité des cellules cancéreuses et augmente le taux d'apoptose des cellules. Le AUY922 entraîne le clivage des protéines PARP et de la caspase-3 et augmente l'expression d'un client de HSP90 et de la protéine survivine. Cette sur-expression de la survivine atténue l'inhibition de la croissance cellulaire et l'apoptose (*Liu, 2017*).
- Le PU-H71 est un inhibiteur HSP90 de nouvelle génération qui présente une activité anticancéreuse dans de multiples tumeurs. Il inhibe la fonction chaperon de HSP90 en favorisant la dégradation par le protéasome des protéines de signalisation impliquées dans la

prolifération et la survie des cellules tumorales. Dans la leucémie lymphocytaire chronique (CLL), le PU-H71 déstabilise les kinases du récepteur des cellules B et induit l'apoptose mitochondriale des cellules CLL (Guo, 2017). De plus, le PU-H71 inhibe la voie PI3K/mTOR dans le lymphome de Burkitt par la dérégulation de la protéine MYC (Giulino-Roth, 2017).

- La geldanamycine, extraite de *Streptomyces hygroscopicus*, a un effet anti-cancéreux car il bloque le site de liaison à l'ATP de HSP90 et inhibe sa fonction stabilisatrice des clients (Patel, 2011). La geldanamycine restaure également la sensibilité des cellules cancéreuses au paclitaxel par inactivation de la voie p38/H2AX (Mo, 2016).
- L'inhibiteur 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) est un dérivé de la geldanamycine, moins toxique pour le foie que cette dernière. Dans les cellules tumorales, le 17-AAG se lie au site de liaison ATP de HSP90 et inhibe spécifiquement ses fonctions de chaperon (Kamal, 2003). Ce médicament induit la dégradation de certaines protéines clientes telles que Cdk4, Raf-1, EGFR, ErbB-2 et Akt (Grbovic, 2006 ; Vaughan, 2006). 17-AAG inhibe également le processus de recombinaison homologue (Noguchi, 2006). Cet inhibiteur a déjà passé l'essai clinique de phase I (Goetz, 2005) et des essais de phase II sont en cours.
- TAS-116 est un inhibiteur cytosolique sélectif de HSP90 α et β . Contrairement à d'autres inhibiteurs tels que 17-AAG, 17-DMAG ou NVP-AUY922, le TAS-116 n'inhibe pas les paralogues de HSP90 tels que GRP94 ou TRAP1 (spécifique du Reticulum Endoplasmique ou de la mitochondrie respectivement). Il a été démontré qu'il exerce des activités anti-tumorales en diminuant les niveaux des protéines clientes HER2, HER3 et AKT entraînant l'inhibition des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK (Ohkubo, 2015).
- L'inhibiteur C-terminal de HSP90, KU675, présente des effets anti-prolifératifs et cytotoxiques en inhibant l'activité de HSP90 et en favorisant la dégradation de ses protéines clientes comme Akt, B-Raf, cdc25C et Her2/ErB2 (Liu, 2015). Les auteurs ont également montré que KU675 inhibe préférentiellement l'isoforme HSP90 α ainsi que HSP70.
- Les inhibiteurs N-terminaux de HSP90 qui ciblent la poche de liaison ATP ont de forts effets anti-prolifératifs (Whitesell and Lindquist, 2005). Un inconvénient majeur est qu'ils induisent une réponse de choc thermique (HSR), qui se traduit par une augmentation du niveau d'expression de plusieurs HSP (HSP27, HSP40, HSP70, et HSP90) à la même concentration entraînant la dégradation des protéines clientes (Powers and Workman, 2007). Contrairement aux inhibiteurs N-terminal, les inhibiteurs C-terminal induisent la dégradation des protéines clientes de HSP90 sans pour autant augmenter le niveau d'expression des HSP (Shelton, 2009 ; Eskew, 2011). Dans le cas d'un cancer du sein triple

négatif, l'inhibiteur C-terminal de HSP90, L80, réduit efficacement la prolifération cellulaire, la résistance au traitement, la croissance tumorale et la génération de métastases en inhibant la signalisation AKT/MEK/ERK/JAK2/STAT3, sans affecter les cellules normales (Cho, 2019).

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

C. HSP90 et résistance aux traitements anti-cancéreux

Diverses lignées cellulaires cancéreuses résistantes aux traitements ont une expression augmentée de HSP90 et une sur-activation des voies de signalisation pro-survie et de progression du cycle cellulaire. L'expression de HSP90 est induite par les agents chimio-thérapeutiques couramment utilisés, à savoir la doxorubicine, le cisplatine et le méthotrexate (Xiao, 2018). Une étude sur les mécanismes impliqués a indiqué que l'expression accrue du HSP90 ainsi que de ses protéines clientes, l'EGFR, l'IGF-1R et le Src, favorisent l'autophagie dans les cellules cancéreuses et confèrent une résistance aux médicaments (Ahn, 2015). La signalisation médiée par HSP90 a été identifiée comme la principale cause de résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie (Yao, 2018 ; Zaidi, 2009). Par conséquent, le ciblage du HSP90 à l'aide de nombreux inhibiteurs candidats a été considéré comme une stratégie attrayante pour sensibiliser certains cancers à la radiothérapie.

L'utilisation de l'inhibiteur de HSP90, AUY922, s'est révélée efficace pour tuer en synergie les cellules HNSCC (« *head and neck squamous cell carcinoma* ») par fragmentation chromosomique (McLaughlin, 2017). Dans le cas du cancer du poumon, une approche combinée qui déplete HSF-1 et inhibe HSP90 via l'inhibiteur NVP-AUY922 empêche l'expression et l'activation de la protéine AKT (client de HSP90) et est délétère pour la recombinaison homologue (Hammond, 2016).

L'inhibiteur de HSP90, Ganetespib, a été identifié comme un radio-sensibilisateur qui agit par modulation des voies HIF-1 α , STAT3 et AKT dans l'adéno-carcinome canalaire pancréatique (Nagaraju, 2019). De plus, le Ganetespib limite considérablement la survie des cellules cancéreuses en provoquant l'arrêt G2-M et en perturbant la réponse aux dommages à l'ADN pendant l'irradiation (Wang, 2016).

Le PU-H71, inhibiteur de HSP90, présente une efficacité thérapeutique dans l'inhibition de la survie cellulaire et de l'accumulation des dommages à l'ADN par suppression de RAD51 et KU70 ; il est actuellement évalué dans le cadre d'essais cliniques (Li, 2016). Le PU-H71 sensibilise les

cellules tumorales à la radiothérapie par ion de carbone (CIRT) en interrompant les machineries de recombinaison homologue et non-homologue (NHEJ).

De même, TAS-116 inhibe la survie des cellules cancéreuses en radiothérapie en interrompant les systèmes de réparation à double brin de l'ADN (Lee Y, 2017).

II. Rôle du R2TP dans le cancer

A. Les RUVBL dans la cellule cancéreuse

1. Expression et rôle des RUVBL

RUVBL1 et RUVBL2 interagissent avec un certain nombre de facteurs de transcription fortement impliqués dans la tumorigénèse. Parmi eux, les plus importants sont la β -caténine (Bauer, 2000), Myc (Wood, 2000), E2F1 (seulement RUVBL1 ; Dugan, 2002) et ATF2 (seulement RUVBL2 ; Cho, 2001). RUVBL1 et/ou RUVBL2 se lie également directement aux promoteurs comme celui des gènes c-Myc (Franck, 2003), E2F1 (Taubert, 2004) ou encore NF- κ B (Kim, 2005). Le rôle des RUVBL sur ces différents acteurs est toujours de favoriser la prolifération et la survie cellulaire qui sont cruciales pour le développement des cancers (Mao and Houry, 2017). Les implications de RUVBL1/2 dans ces différentes voies sont résumées dans le **Tableau 2**.

Il est bien établi que les RUVBL sont impliqués dans de nombreux cancers de par leur rôle dans l'apoptose, la réparation de l'ADN ou encore la régulation de la transcription (Haurie, 2009 ; Berasain, 2010 ; Ménard, 2010 ; Raymond, 2015). Leur sur-expression dans les cancers est associée à un mauvais pronostic notamment dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cancer colorectal (Grigoletto, 2011). On retrouve également RUVBL1 et RUVBL2 surexprimés dans une variété de tumeurs solides humaines telles que dans les cancers du colon (Graudens, 2006 ; Ki, 2007), de l'estomac (Li, 2010), de la vessie (Dyrskjot, 2004 ; Sanchez-Carbayo, 2006), du poumon (Dehan, 2007) et dans le mésothéliome (Zhan, 2007), ainsi que dans plusieurs types de leucémies aiguës (Andersson, 2007) ou chroniques (Haslinger, 2004).

Une mutation dans le domaine Walker A de RUVBL1 et RUVBL2 empêche sa liaison à l'ATP tandis qu'une mutation dans le domaine Walker B n'affecte pas la liaison à l'ATP mais l'hydrolyse du nucléotide. En utilisant ces mutants, plusieurs publications ont montré que l'activité ATPase de RUVBL1 était nécessaire pour la croissance et la viabilité des cellules chez la levure (Strub, 2000 ; King, 2001). De même, le mutant D302N du Walker B de RUVBL1 empêche la biogenèse de la télomérase dans des cellules humaines (Venteicher, 2008) et inhibe la transformation cellulaire par les oncogènes tels que c-Myc (Wood, 2000), β -catenin (Feng, 2003) ou E1A (Dugan, 2002). La diminution de l'expression de RUVBL1 et RUVBL2 *in vitro* par siARN entraîne une réduction de la

croissance et l'apoptose des cellules tumorales (Rousseau, 2007 ; Haurie, 2009). De plus, l'inhibition *in vivo* de RUVBL2 dans les xénogreffes de tumeurs diminue considérablement la progression tumorale (Ménard, 2010). Ces caractéristiques indiquent que RUVBL1 et RUVBL2 pourraient être de bons candidats dans les thérapies anticancéreuses et que cibler leur activité ATPase serait une bonne stratégie dans la lutte contre le cancer.

2. RUVBL : Biomarqueurs cancéreux et cibles thérapeutiques

A travers les études de cette dernière décennie, les RUVBL sont apparues comme de bons biomarqueurs de malignité dans les cancers. En effet, les concentrations de RUVBL1 sont déjà utilisées comme biomarqueur pour distinguer le carcinome épidermoïde oesophagien (ESCC) des tissus normaux (Lauscher, 2007 ; Lauscher, 2012 ; Tung, 2013). RUVBL2 est, quant à lui, sur-exprimé dans les tissus primaires des cancers gastriques et du côlon (Li, 2010 ; Flavin, 2011 ; Milone, 2016). Chez les patients atteints de Carcinome Hépatocellulaire (CHC), il a été constaté une corrélation entre une localisation cytoplasmique de RUVBL1 et RUVBL2 et l'apparition de métastases associée à un pronostic défavorable (Rousseau, 2007 ; Haurie, 2009 ; Ren, 2013). Il reste à déterminer si cette corrélation peut s'appliquer à d'autres types de cancer où l'expression cytoplasmique a également été démontrée.

Il a été montré que l'activité ATPase des RUVBL est requise pour la croissance tumorale des cellules de Carcinome Hépatocellulaire (CHC) (Ménard, 2010). L'activité ATPase des RUVBL pourrait ainsi être nécessaire à de nombreux processus importants pour la cancérogenèse et constituer une cible intéressante dans les traitements anticancéreux. Les RUVBL pourraient également être des facteurs de résistance au traitement, notamment par leur rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN via leur implication dans les complexes de remodelage et la régulation de la stabilité des PIKK ATM, ATR et DNAPK-cs (Raymond, 2015). Cela suggère qu'inhiber les RUVBL pourrait sensibiliser les cellules aux traitements ionisants ou simplement limiter les résistances. Guo *et al.* ont déplété RUVBL1 et montré que la prolifération cellulaire, la motilité cellulaire et la tumorigénicité *in vivo* avaient été significativement réduites. Ces auteurs concluent en expliquant que RUVBL1 pourrait être un accélérateur important de la migration, ainsi que de l'invasion des métastases du cancer du poumon (Guo, 2018). Ces nouvelles découvertes indiquent que la RUVBL1 est un facteur clé de la tumorigénèse et que le ciblage de la RUVBL1 pourrait constituer une stratégie thérapeutique potentielle pour le cancer du poumon.

La recherche, *in silico*, des inhibiteurs des ATPase RUVBL1 et RUVBL2 a permis d'identifier plusieurs nouveaux composés (Elkaim, 2012). Trois de ces composés ont montré des activités anti-prolifératives sur les cellules tumorales. Deux composés se lient de manière concurrentielle à la poche de liaison de l'ATP (Elkaim, 2014). Le dernier composé induit l'apoptose ainsi que la

nécrose dans les essais cellulaires et a donc le potentiel d'être développé comme un agent thérapeutique. Un laboratoire privé Japonais a également identifié par criblage à haut-débit, des inhibiteurs spécifiques de l'ATPase des RUVBL (brevet WO2015125786A1 ; *Mao and Houry, 2017*). Ces composés ont inhibé la prolifération des cellules tumorales *in vitro* ainsi que démontré des activités anti-tumorales *in vivo* avec des xénogreffes humaines chez la souris (*Mao and Houry, 2017*).

CB-6644 est un inhibiteur allostérique de l'activité ATPase du complexe RUVBL1/2. *Assimon et al.*, ont montré qu'il interagit spécifiquement avec RUVBL1/2 dans les cellules cancéreuses, entraînant la mort cellulaire. Dans des xénogreffes de leucémie myéloïde aiguë et de myélome multiple, le CB-6644 a réduit significativement la croissance tumorale sans toxicité forte. Ces travaux démontrent le potentiel thérapeutique de cibler les RUVBL dans le traitement du cancer (*Assimon, 2019*). *Yenerall et al.*, ont également montré que l'activité RUVBL1/2 ATPase était nécessaire pour la maturation ou le désassemblage du complexe PAQosome mais pas pour le complexe INO80. En traitant des xénogreffes NSCLC par CB-6644, ils améliorent l'efficacité du traitement par radiation dans les cellules cancéreuses mais pas les cellules normales. La combinaison de l'inhibition de RUVBL1/2 avec le traitement par radiation peut représenter la meilleure voie à suivre pour l'utilisation clinique des inhibiteurs des RUVBL (*Yenerall, 2020*).

B. RPAP3 et cancers colorectaux

La plupart des cancers surviennent en raison de l'instabilité génomique et de la conversion maligne induites par l'accumulation de mutations dans des gènes critiques (ex. p53) (*Kastan and Bartek, 2004*). Au cours de la progression du cancer, la tumeur naissante subit un stress oncogénique, qui est une réponse des dommages à l'ADN qui retarde ou élimine ces cellules dangereuses (*Bartkova, 2005 ; Gorgoulis, 2005*). La sur-expression de RPAP3 dans les cellules HEK293 potentialise l'apoptose et l'activation de la caspase 3 induite par le TNF α (« *Tumor Necrosis Factor α* ») et le cycloheximide (CHX).

Ni *et al.* ont montré que la déplétion de RPAP3 atténue les dommages induits par les UV sur l'ADN (*Ni, 2009*). La déplétion de RPAP3 par RNAi a amélioré la survie des cellules HeLa après l'induction de dommages à l'ADN par UV. De plus, la sur-expression de RPAP3 dans les cellules HEK293 a favorisé la mort cellulaire après des dommages à l'ADN par UV, ce qui suggère que RPAP3 peut être un facteur lié à la mort cellulaire, soit dans la voie d'apoptose induite par le TNF α , soit dans la voie activée par les dommages UV. RPAP3 a donc potentiellement des rôles dans la suppression des tumeurs, la réparation des dommages à l'ADN, et les points de contrôle du cycle cellulaire (*Ni, 2009*). Maurizy *et al.*, ont également montré le rôle de RPAP3 dans l'épithélium intestinales de souris (*Maurizy, en révision chez Nat Commun*).

En cherchant des composés induisant la différenciation dans des cellules de leucémie myéloïde chronique, chez l'éponge de mer *Dactylospongia elegans*, plusieurs molécules ont été trouvées dont la dictyoceratine-A et -C (*Aoki, 2004*). Ces deux composés ont une activité inhibitrice de la prolifération en condition hypoxie dans les cellules cancéreuses de la prostate (*Arai, 2014*). Ce n'est que récemment qu'on a découvert que RPAP3 était le substrat de la dictyoceratine-A et -C (*Kawachi, 2019*).

HIF-1 α (« *Hypoxia-Inducible Factor* »), est un régulateur central de l'homoéostasie de l'oxygène et entraîne une prolifération tumorale en condition d'hypoxie. Dans les cellules cancéreuses de la prostate, en condition d'hypoxie, l'expression de HIF-1 α est très élevée tout comme celle de ses substrats HK2 (« *Hexokinase 2* ») et VEGF (« *Vascular endothelial growth factor* »). Traiter les cellules, toujours en condition d'hypoxie, avec la dictyoceratine-A ou -C induit une diminution des niveaux d'expression de HIF-1, HK2 et VEGF sans affecter ceux de RPAP3. De plus, une sur-expression de RPAP3 annule l'effet inhibiteur de la dictyoceratine-A indiquant que ce composé est spécifique de RPAP3 (*Kawachi, 2019*). Les auteurs ont également identifié que la dictyoceratine-A et -C se fixait au niveau des acides aminés 109-231 chevauchant le TPR1 (133-243) C'est également la région d'interaction avec le motif MEEVD en C-Ter de HSP90. On peut donc penser que la drogue inhibe directement l'interaction entre RPAP3 et HSP90 (*Kawachi, 2019*).

C. Rôle des PFDL dans le cancer

De même que les autres membres du PAQosome, les protéines PFDL sont liées à la cancérogenèse et à la progression tumorale. Tout d'abord, URI1 est amplifié dans plusieurs types de cancer tels que le cancer de l'ovaire (*Theurillat, 2011*), du col de l'utérus (*Gu, 2013a*), de l'endomètre (*Gu, 2013b*) et le carcinome hépatocellulaire (*Yang, 2013*). Initialement, l'augmentation de l'expression de URI1 a été attribuée à un des régulateurs du cycle cellulaire, la cycline E (*Lin, 2000*). Des résultats plus récents, ont mis en évidence le caractère oncogène de URI1 lui-même (*Theurillat, 2011 ; Wang, 2015*). Il a été démontré que la protéine favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et joue donc sur l'invasion tumorale et sur le développement de métastases du carcinome hépatocellulaire (*Zhou W, 2017*).

Une autre préfoldine, UXT, est également surexprimée dans certaines formes de cancers, y compris les cancers de la vessie, du sein, des ovaires et de la thyroïde (*Zhao, 2005b*). En revanche, dans le cancer de la prostate, elle s'exprime moins (*Taneja, 2004*). UXT est également fortement exprimée dans un certain nombre de carcinomes mammaires primaires (*Sanchez-Morgan, 2017*). UXT peut se lier à la fois aux récepteurs aux oestrogènes, et inhiber leur activité transcriptionnelle, et aux récepteurs aux androgènes où des résultats contradictoires ne permettent pas de dire s'il active ou inhibe l'activité transcriptionnelle du récepteur (*Taneja, 2004 ; Markus, 2002 ; Nwachukwu, 2009*). Cette différence d'effet vient de l'existence de deux isoformes. L'isoforme UXT-V1 a 12 résidus supplémentaires à son N-terminus permettant l'interaction avec TRAF2 (*Sethurathinam, 2013*). UXT-V1 est cytoplasmique et protège les cellules contre l'apoptose induite par TNF (*Huang, 2011*). UXT-V2 est plus court et principalement nucléaire. Il forme un complexe avec NF- κ B et est recruté sur l'enhanceosome NF- κ B après stimulation (*Sun, 2007*). La régulation de l'épissage alternatif UXT est médiée par un ARN long non codant (lncRNAs) qui favorise l'expression de l'isoforme UXT-V2 et diminue l'apoptose, et qui est régulée dans le cancer colorectal (*Yin, 2017*). UXT peut également jouer un rôle dans la promotion de la progression tumorale et de la métastase en favorisant l'angiogenèse par l'inhibition de la signalisation Notch (*Zhou, 2015*).

Pour finir, la préfoldine PDRG1 est surexprimée dans un certain nombre de tumeurs malignes mais l'implication de la protéine dans le développement tumoral n'est pas encore bien comprise (*Tao, 2016 ; Jiang, 2011 ; Pajares, 2017*).

III. La voie mTOR dans la cancérogenèse

Le cancer est une maladie multifactorielle et complexe qui est connue pour être la principale cause de décès humains dans le monde. La voie PI3K-AKT-mTOR est l'une des voies de signalisation les plus dérégulées dans les cancers. mTOR est considéré comme un régulateur principal de cette voie de signalisation et des découvertes récentes ont indiqué que mTOR a un rôle central dans la transformation, la croissance et la survie des cellules cancéreuses (*Saxton and Sabatini, 2017 ; Zhou and Huang, 2011 ; Mossmann, 2018*). La protéine mTOR est hyperactive dans 80 % des cancers humains (*Menon and Manning, 2008*). La dérégulation des voies de signalisation en amont de mTOR abouti à son hyper-activation dans les cancers, bien que la protéine mTOR elle-même subisse des mutations altérant ses fonctions (*Murugan, 2019*).

A. Altérations des voies de signalisation en amont de mTOR

Les mutations oncogènes entraînent une croissance excessive et une perte des mécanismes de l'apoptose ou de l'autophagie, il peut s'agir d'une copie surnuméraire d'un gène ou d'une modification d'un gène. La littérature récente montre que mTOR est fréquemment dérégulé génétiquement, ce qui inclut l'amplification et la mutation des gènes (*Murugan AK, Seminars in Cancer Biology, 2019*). Les pro-oncogènes RAS sont souvent retrouvés modifiés dans les cancers humains (*Downward, 2003*). Les RAS sur-exprimés vont directement activer la voie MAPK qui active à son tour la voie PI3K/AKT qui inactive le complexe TSC (*Ma, 2005 ; Ballif, 2005 ; Manning, 2002*). De plus, Raptor est directement phosphorylé par RSK afin d'accroître davantage l'activité de mTORC1 (*Carrière, 2008*). L'amplification génique des protéines en amont de PI3K et de RAS est également couramment détectée dans les cancers, ce qui conduit à la sur-activation des deux complexes mTOR.

Étant donné le grand nombre de voies de signalisation qui régulent mTORC1 par le complexe TSC, la suppression de ce dernier est ce qui entraîne les sur-activations constitutives de mTORC1 les plus élevées. Cependant, la perte d'un certain nombre de suppresseurs de tumeurs en amont entraîne aussi des augmentations de l'activité de mTORC1. Une activité mTORC1 élevée a été détectée dans des tumeurs de modèles murins avec des mutations dans la protéine PTEN (« *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* ») (*Podsypanina, 2001*), LKB1 (« *Liver kinase B1* ») (*Shaw, 2004*) ou NF1 (« *neurofibromatosis 1* ») (*Dasgupta, 2005 ; Johannessen, 2008*). La perte de ces suppresseurs de tumeurs entraîne soit l'activation des voies qui inhibent le complexe TSC (PTEN et NF1), soit l'inhibition des voies qui activent le complexe TSC (LKB1), ce qui entraîne une augmentation d'activité de mTORC1. Dans les cellules dépourvues des protéines PTEN ou NF1, TSC2 est phosphorylé au niveau des sites de phosphorylation de AKT

(Ser939 et Thr1462) sans que ce dernier ne soit actif (*Manning, 2002 ; Johannessen, 2005*). De plus, l'augmentation de l'activité mTORC1 qui en découle va permettre le développement de tumeurs chez la souris (*Podsypanina, 2001 ; Johannessen, 2008*). Des mutations des trois protéines du complexe GATOR1 ont été mises en cause dans le glioblastome (*Bar-Peled, 2013*), tandis que des mutations RagC et FLCN ont été découvertes dans le lymphome folliculaire et le syndrome de Birt–Hogg–Dubé (*Okosun, 2016 ; Nickerson, 2002*). En attendant, l'hyper-activation de mTORC2 peut aggraver les pronostics négatifs de cancer en activant AKT et en soutenant les transformations cytosquelettiques qui sous-tendent la métastase (*Schmidt, 2018 ; Morrison Joly, 2017*).

B. Mutations oncogéniques de la protéine mTOR

Initialement, l'hyper-activation de mTOR a été observée dans des cellules cancéreuses avec un mutant de mTOR sur-exprimé et qui avait une activité kinase 3 fois supérieure à celle de la protéine endogène (*Sekulić, 2000*). Les auteurs ont également noté que mTOR était la cible directe de la voie PI3K/AKT. Plus tard, il a été montré que ce mutant favorisait la formation de colonies cancéreuses chez la souris en contribuant à la transformation et la survie cellulaire (*Edinger and Thompson, 2004*). Des études chez la levure ont permis d'identifier plusieurs mutations activatrices sur TOR1 et TOR2 favorisant la croissance même en absence de Rhb1 (homologue de Rheb chez la levure). De plus, mTOR reste actif même en cas de carence en nutriments ou d'inhibition par la rapamycin (*Reinke, 2006 ; Urano, 2007 ; Ohne, 2008*). En 2013, Murugan *et al.* ont montré que les mutations de la protéine mTOR dans les domaines HEAT, FAT et kinase de mTOR pouvaient entraîner le développement d'une tumeur *in vivo* (*Murugan, 2013*). Ils ont constaté *in vitro* et *in vivo* que ces mutations augmentaient l'activité kinase et activaient la voie S6K et AKT. De plus, ces mutations ont induit une transformation cellulaire, une invasion des cellules et une formation rapide de tumeurs chez la souris (*Murugan, 2013*). C'est la première fois que les mutations de la protéine mTOR ont été directement mis en cause dans la tumorigénèse.

C. Traitements anticancéreux ciblant mTOR

À ce jour, les inhibiteurs de mTOR n'ont pas rencontré beaucoup de succès comme agents chimio-thérapeutiques. La première génération de dérivés cliniques de la rapamycine, ou rapalogues, n'ont pas montré d'effets cytotoxiques (*Vander Haar, 2007*). Ils bloquent partiellement la traduction dépendante de la protéine 4E-BP et n'inhibe pas du tout les voies régulées par mTORC2 et AKT (*Hsieh, 2012 ; Tabernero, 2008*). De plus, l'inhibition de mTORC1 entraîne de

l'autophagie ce qui permet aux cellules de survivre dans un micro-environnement pauvre en nutriments (*Palm, 2015*). Une deuxième génération d'inhibiteurs de mTOR entre en compétition avec l'ATP pour bloquer le site actif de la kinase. Ces inhibiteurs inhibent cette fois tous les substrats de mTORC1 et mTORC2 (*Thoreen, 2009 ; Feldman, 2009 ; García-Martínez, 2009*). Ces inhibiteurs de deuxième génération doivent cependant être utilisés sur des temps courts et à des doses modérées à cause de leurs effets généraux sur les tissus et de leur cytotoxicité (*Ghobrial, 2016*). En effet, un traitement prolongé avec ces inhibiteurs entraîne une réactivation de la voie AKT dans les cellules cancéreuses sans que mTORC2 n'en soit responsable (*Rodrik-Outmezguine, 2011 ; Rodrik-Outmezguine, 2016 ; Fan, 2017*). La troisième génération d'inhibiteurs de mTOR, ou « RapaLink » utilise les mêmes sites de fixation que les première et deuxième générations pour créer une interaction bivalente qui permet exclusivement d'inhiber les mutants mTOR résistants aux médicaments. La molécule RapaLink-1 montre une inhibition plus forte de mTOR avec une réduction des niveaux de p4EBP1 et un arrêt de la croissance cellulaire (*Rodrik-Outmezguine, 2016*). Rapa-Link-1 se lie à la protéine FKBP12, un inhibiteur de mTORC1, ce qui permet son accumulation dans la cellule. Cet effet pourrait améliorer l'efficacité de l'inhibiteur et potentiellement bloquer les mutants de mTOR associés au cancer (*Fan, 2017*).

OBJECTIFS

Certaines mutations prédisposent aux cancers, déclenchent leur développement et affectent la réponse aux traitements. Des anomalies de synthèse protéique sont fréquentes dans les cancers et favorisent le développement et la dissémination des tumeurs. HSP90 est une cible privilégiée dans les traitements anticancéreux car elle joue un rôle important dans le repliement de protéines oncogéniques et donc dans la tumorigenèse. Parmi ses clients, on retrouve des protéines kinases comme AKT, des facteurs de transcriptions comme NF- κ B ou p53, des E3 ubiquitines ligases comme les protéines TRIM et des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (*Schopf, 2017 ; Radli and Rüdiger, 2018 ; Mayer and Le Breton, 2015 ; Röhl, 2013 ; Taipale, 2012*). A cause de son implication dans toutes ces voies de signalisation, l'inhibition de HSP90 peut entraîner des effets pléiotropiques non désirés.

HSP90 fonctionne avec des co-chaperons qui sont spécifiques de certaines classes de protéines clientes et qui pourraient être ciblés dans des traitements. Il est donc important de comprendre comment fonctionnent ces co-chaperons et quel est l'ensemble de leurs substrats, et notamment si on peut trouver de nouvelles protéines impliquées dans la voie mTOR. Le R2TP est un co-chaperon de HSP90 qui a la propriété unique d'être impliqué dans l'assemblage de complexes macromoléculaires. Il contient les AAA+ ATPase RUVBL1/2, qui possèdent elles-mêmes une activité chaperon, et les protéines RPAP3 et PIH1D1 qui servent d'adaptateurs et de régulateurs. De manière remarquable, la plupart des substrats connus du R2TP sont impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire. Ceux-ci comprennent des membres de la famille des PIKK et notamment mTOR, ainsi que des machineries basales comme les ARN polymérases ou les snoRNP/snRNP.

Le domaine N-terminal de PIH1D1 (PIH1D1-NTER) est un domaine d'interaction avec plusieurs clients connus du R2TP. Certains d'entre eux possèdent un motif consensus DSDD/E avec la sérine phosphorylée qui permet une interaction directe avec une poche de reconnaissance contenue dans PIH1D-NTER. Dans le but de mieux caractériser le mécanisme d'action du système HSP90/R2TP, je me suis intéressée au domaine PIH1D1-NTER pour savoir quels autres substrats interagissaient avec lui et de quelle manière. J'ai donc étudié par protéomique quantitative les partenaires de PIH1D1-NTER après purification par affinité. En plus de nombreux substrats connus du R2TP, j'ai identifié les sous-unités du complexe TSC (« *Tuberous Sclerosis complex* ») : TSC1, TSC2 et TBC1D7. Ceci est très intéressant car ce complexe est un suppresseur de tumeurs. En effet, des mutations dans TSC1 ou TSC2 conduisent à une maladie génétique, la sclérose tubéreuse, où les patients développent des tumeurs bénignes dans de nombreux organes. Le TSC agit comme un

régulateur négatif du complexe mTORC1 qui contrôle la croissance cellulaire en réponse aux nutriments, aux facteurs de croissance et aux niveaux d'énergie. Ainsi, le système HSP90/R2TP semble agir à deux niveaux sur la voie mTOR : sur mTOR elle-même et sur un de ses régulateurs les plus importants, le complexe TSC. Il était donc important de confirmer et de comprendre la signification de cette interaction.

Mon projet de thèse visait à caractériser les liens physiques et fonctionnels entre le R2TP et le TSC, et il comportait trois objectifs :

1. Le premier objectif était de caractériser cette interaction au niveau moléculaire. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de protéomique, de phospho-protéomique, des tests d'interactions systématiques par double-hybride ou IP LUMIER. Les résultats ont permis notamment de définir un domaine de TSC1 interagissant directement avec PIH1D1-NTER *in vitro*.
2. Le deuxième objectif était de déterminer si le R2TP est impliqué dans l'assemblage du complexe TSC. Pour cela, j'ai souhaité inactiver le R2TP en générant une lignée cellulaire « Knock out » pour PIH1D1 et en utilisant une drogue inhibant l'activité ATPase des RUVBL 1 et 2 (CB6644) pour mettre en évidence un défaut d'assemblage du complexe TSC dans ces conditions.
3. Un dernier objectif était d'évaluer l'impact de l'inactivation de PIH1D1 sur la voie mTORC1. Pour cela, j'ai réalisé des mesures d'activité de cette voie après un traitement à l'insuline dans des cellules sauvages et des cellules KO pour PIH1D1.

Le complexe TSC régule négativement la voie mTOR donc l'interaction avec le R2TP est très intéressante car elle ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement des cancers. Mieux comprendre la nature du lien entre TSC et R2TP devrait contribuer à la compréhension des mécanismes liés à la transformation cellulaire et à la tumorigenèse.

RÉSULTATS

ARTICLE 1 : HSP90/R2TP system works as a platform for assembly of TSC complex

Claire Abéza^{1,2,3}, Marie-Eve Chagot⁴, Justine Schneider⁵, Marie-Cécile Robert^{1,2,3}, Franck Vandermoere⁶, Christine Schaeffer⁵, Bruno Charpentier⁴, Xavier Manival⁴, Sarah Cianferani⁶, Edouard Bertrand^{1,2,3*} and Céline Verheggen^{1,2,3*}

1 IGMM, CNRS, Univ Montpellier, Montpellier, France.

2 Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Montpellier, France.

3 IGH, CNRS, Univ Montpellier, Montpellier, France

4 Université de Lorraine, CNRS, IMoPA, F-54000 Nancy, France

5 LSMBO, IPHC, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, Strasbourg, France

6 IGF, CNRS, INSERM, Univ Montpellier, Montpellier, France

*: co-corresponding authors

Résumé

Le R2TP est un co-chaperon de HSP90 impliqué dans l'assemblage de complexes macromoléculaires (Houry, 2018). C'est un complexe de quatre sous-unités (RPAP3, PIH1D1, RUVBL1/2), dont trois sont sur-exprimées dans des cancers. Caractériser tous les substrats du système HSP90 /R2TP pourrait ainsi révéler de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques aux cellules cancéreuses. Mon équipe et d'autres ont montré que le R2TP constitue une plateforme d'assemblage des snoRNP, des snRNP ou des complexes multi-protéiques (Houry, 2018). J'ai donc effectué des expériences de protéomique quantitative avec le domaine NTER de PIH1D1 comme appât pour trouver de nouvelles complexes. J'ai identifié les sous-unités du « Tuberos Sclerosis Complex » (TSC) TSC1, TSC2 et TBC1D7 qui est un suppresseur de tumeur et un régulateur clé de mTOR. Ces résultats préliminaires suggèrent que le système HSP90/R2TP pourrait constituer une plateforme sur laquelle TSC1, TSC2 et TBC1D7 viendraient interagir et s'associer. L'objectif principal était de comprendre le lien fonctionnel entre le TSC et le R2TP. Ce projet s'est articulé autour de trois axes. 1-Caractériser les interactions entre le système HSP90/R2TP et les sous-unités du TSC. 2-Déterminer si le R2TP assemble le complexe TSC. 3-Evaluer l'impact du R2TP sur la voie métabolique de mTOR.

J'ai donc dans un premier temps cherché à caractériser les interactions entre le système

HSP90/R2TP et les sous-unités du TSC. J'ai tout d'abord réalisé des analyses protéomiques sur des immuno-précipitations de PIH1D1 ou son domaine NTER WT ou mutant dans la poche de liaison aux substrats (NTER_K64A). En comparant les substrats trouvés en association avec PIH1D1 entier, NTER ou NTER_K64A, j'ai pu voir que TSC1, TSC2 et TBC1D7 interagissaient spécifiquement avec PIH1D1 NTER. Grâce à une immuno-précipitation à haut débit (IP LUMIER), j'ai mis en évidence que seul TSC1 interagissait avec PIH1D1 et que TSC2 et TBC1D7 quand à eux pouvaient s'associer avec les autres composants du R2TP dont RPAP3. Toutes ses interactions ont été confirmées par double-hybride. En réalisant un traitement inhibant HSP90, j'ai aussi montré que TSC1 et TSC2 étaient déstabilisés en absence de chaperon fonctionnel. Les deux protéines sont donc des clients de HSP90 et c'est via HSP90 que TSC2 arrive sur le R2TP. Après une analyse protéomiques permettant d'enrichir les peptides phosphorylés en interaction avec PIH1D1 NTER, j'avais identifié plusieurs peptides phosphorylés sur TSC1 et TSC2. Une expérience d'IP LUMIER entre PIH1D1_NTER et TSC1 ou TSC2 en présence de phosphatase m'a permis de conclure que ces interactions n'étaient pas phospho-dépendantes.

Ensuite, pour déterminer si le R2TP assemble le complexe TSC, j'ai généré des lignées où PIH1D1 était déplété (KO) par CRISPR/Cas9. En absence de PIH1D1, j'observe une diminution de l'interaction entre TSC1 et TSC2. L'interaction entre TBC1D7 et ses deux autres partenaires ne semble pas affectée. Quand, je compare l'association de TSC2 avec RPAP3 en présence ou en absence de PIH1D1, je vois que TSC2 s'associe plus fortement avec RPAP3 en absence de PIH1D1. En considérant que le R2TP joue bien le rôle de plateforme d'assemblage, il est cohérent que TSC2 s'associe plus à RPAP3 si PIH1D1 n'est pas là pour amener TSC1. En effet, ce dernier stabilise TSC2 et empêche sa dégradation.

Le dernier objectif était d'évaluer l'impact du R2TP sur la voie métabolique de mTOR. La voie de signalisation de mTORC1 est régulée par les facteurs de croissance ou encore par le niveau d'énergie de la cellule et entraîne une croissance et une prolifération cellulaire. Puisque le complexe TSC est en interaction avec le système HSP90/R2TP, j'ai cherché à établir le rôle de cette interaction dans la régulation de mTORC1. Pour cela, j'ai traité les cellules contrôles ou les cellules KO.PIH1D1 avec des facteurs de croissance ou des drogues pour mimer des activations ou inhibitions de la voie mTORC1 et évaluer les variations dues à l'absence de PIH1D1. J'identifie les modifications dans la voie de signalisation en visualisant les protéines mTOR, S6K un substrat de mTOR, S6 un substrat de S6K et AKT par western blot. Les résultats laissent penser que dans les cellules KO.PIH1D1 la voie de signalisation PI3K/mTOR est toujours active. Cependant la régulation par des signaux énergétiques sont moins efficaces laissant penser qu'un ou plusieurs facteurs régulateurs ne sont plus fonctionnels. Un complexe TSC non assemblé et donc non fonctionnel pourrait créer cet effet en ne régulant plus finement mTORC1 en fonction des facteurs

de croissance.

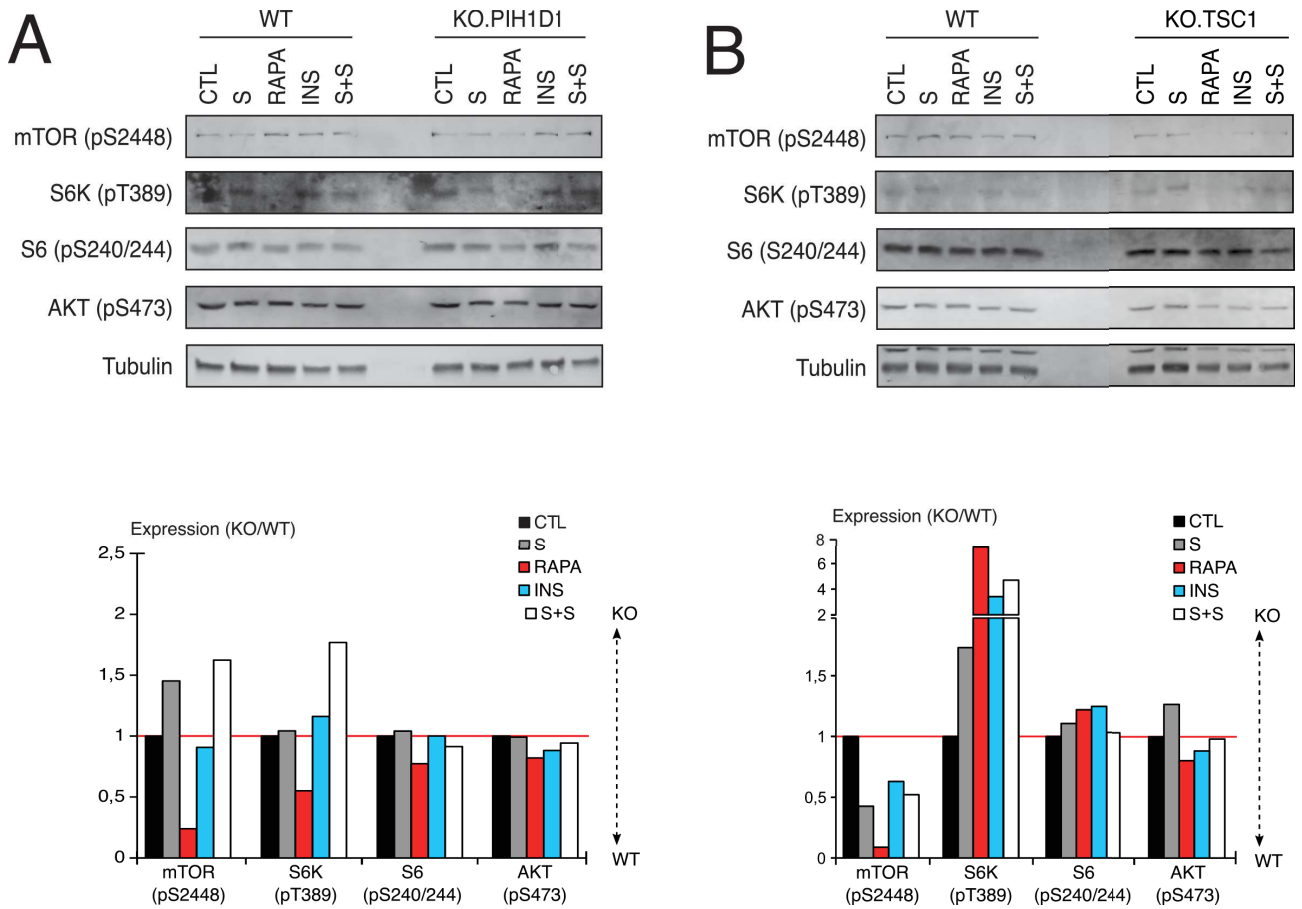
Enfin, j'ai généré des lignées cellulaires KO pour TSC1 ou TSC2. L'étude de l'interaction de TSC2 avec les facteurs du R2TP dans ces cellules montrent qu'elle n'est pas dépendante de TSC1. Dans ces cellules, l'autre partenaire en fusion GFP sera étudié pour visualiser un changement de localisation cellulaire ou dans des expériences de protéomique quantitative en utilisant la GFP comme appât. Nous pourrions ainsi caractériser les complexes formés par les sous-unités du TSC avant qu'elles soient assemblées au sein du complexe TSC et mettre en évidence des co-facteurs.

Résultats non inclus dans l'article de thèse

Evaluer l'impact du R2TP sur la voie métabolique mTOR.

La voie de signalisation de mTORC1 est régulée par les facteurs de croissances ou encore le niveau d'énergie de la cellule et induit une croissance et une prolifération cellulaire. Puisque le complexe TSC est en interaction avec le système HSP90/R2TP, j'ai cherché à établir le rôle de cette interaction dans la régulation de mTORC1. Différents traitements ont été testés sur des cellules contrôle ou déplétées pour PIH1D1 (*Figure 21 A*) ou TSC1 (*Figure 21 B*). Dans la condition sans sérum (S), les cellules ont été privées de sérum durant 10 min avant d'être lysées et une diminution de la phosphorylation de AKT est attendue. Pour avoir mTORC1 inhibé (RAPA), les cellules ont été traitées à la rapamycine pendant 10 min en plus de la privation de sérum. J'ai aussi réalisé une condition stimulée par l'insuline (INS). Dans ce cas, les cellules sont privées de sérum durant 10 min avant d'être stimulée avec de l'insuline 10 min. Enfin, dans la condition S+S, les cellules ont été privées en sérum 10 min avant d'être restimulées avec 20% de sérum 10 min. Nous avons ensuite testé par Western blot l'expression de la protéine mTOR phosphorylée (pS2448) ainsi que sa cliente S6K phosphorylée (pT389), la protéine S6 phosphorylée (pS240/244) et la protéine AKT phosphorylée (pS473). Les signaux ont été quantifiés et normalisés par rapport à la tubuline.

Une privation sérum (S) crée une diminution de la phosphorylation de mTOR dans les cellules contrôle comme dans la lignée KO. On mesure cependant plus de mTOR phosphorylé dans les lignées KO que dans les WT. Les résultats laissent penser que, dans les cellules KO PIH1D1, la voie de signalisation PI3K/mTOR est toujours active. Cependant les régulations en fonction des signaux énergétiques sont moins efficaces laissant penser qu'un ou plusieurs facteurs régulateurs ne sont plus fonctionnels. Un complexe TSC non assemblé et donc non fonctionnel pourrait créer cet effet en ne régulant plus finement mTORC1 en fonction des facteurs de croissance.



Abstract

HSP90 and its co-chaperon R2TP work together to assemble and stabilize many macromolecular complexes involved in cell proliferation. R2TP complex is composed of RUVBL1 and RUVBL2 ATPases and two adapter proteins RPAP3 and PIH1D1. The N-terminal domain of PIH1D1 was described to possess a basic pocket that binds phosphorylated peptides on some of the R2TP clients. Subunits of TSC complex (Tuberous Sclerosis) have already been described as interactants of PIH1D1 N-terminal domain. TSC complex is a regulator of mTOR activity. It is composed of TSC1, TSC2 and TBC1D7 subunits. Here we show that TSC1 and TSC2 are both substrates of HSP90, that the HSP90/R2TP system has multiple interaction with TSC complex subunits and that it is functionally involved in the assembly of the TSC complex. We found a direct interaction of TSC1 with the phospho-binding pocket of PIH1D1 N-terminal domain but in a non-canonical manner that is phosphorylation independent. TSC2 and TBC1D7 would also interact with R2TP but independently of PIH1D1. Taken together, these data suggest that R2TP acts as a platform for the independent recruitment of TSC subunits before the assembly of the TSC complex.

Introduction

Most of cellular machineries are protein or RNP macro-molecular complexes. During their biogenesis, they should be perfectly assembled to be functional and this involves chaperones and assembly factors. Among the chaperones, HSP90 works in the folding of proteins at a near native state for a large spectrum of proteins (Mayer and Le Breton, 2015). HSP90 also participates to promote the quaternary folding of a lot of multi-subunit machines. A complex called R2TP is a unique co-chaperone working with HSP90 for the assembly of protein or RNP complexes (Houry et al., 2018). The HSP90/R2TP system was shown to promote the assembly of RNA polymerases, PIKK kinases or RNP complexes such as snoRNPs including telomerase and some snRNPs (Bizarro et al., 2014);(Bizarro et al., 2015; *Cloutier, 2017*; Machado-Pinilla et al., 2012; Malinová et al., 2017; Boulon et al., 2010). In human, R2TP is associated with prefoldins and additional factors to form the PAQosome but their role remains elusive (Houry et al., 2018). The R2TP core is composed of four subunits: RUVBL1 and RUVBL2 that form a hexameric ring and have AAA+ ATPase activity, RPAP3 and PIH1D1. Human RPAP3 possesses two TPR domains that bind HSP70 and HSP90 chaperones through the TPR domain (Martino et al., 2018);(Henri et al., 2018). RPAP3 is central to the R2TP complex because it binds RUVBL1/2 via its C-terminal domain (Maurizy et al., 2018) and PIH1D1 via a short domain downstream of TPR2 (Henri et al., 2018). R2TP is also associated with co-factors that play different roles according to the client R2TP has to assemble. Some of them are adaptors to help recruiting a family of proteins. TEL2 is a protein of the TTT complex which is critical for the assembly of PIKKs (Hořejší et al., 2010) and it was shown to directly interact with PIH1D1 (Pal et al., 2014);(Hořejší et al., 2014). NUFIP and ZNHIT3 have also an adaptor role for the assembly of snoRNPs and snRNP U4 (Boulon et al., 2008); (Bizarro et al., 2014);(Bizarro et al., 2015). ZNHIT2 and ECD have been proposed to be R2TP adaptors during the maturation of U5 snRNP (*Cloutier, 2017*); (Malinová et al., 2017). While ECD is a direct interactant of PIH1D1, ZNHIT2 and ZNHIT3 belong to the Zn-HIT family of protein with several members interacting with RUVBL1/2 (Verheggen et al., 2015). NOPCHAP1 was recently shown to directly interact with RUVBL1/2 and was proposed to act as a client-loading factor that select NOP58 to promote Box C/D snoRNP assembly (Abel et al., 2021).

While R2TP substrate recognition often involves co-factors, a few clients were described to make direct interactions with R2TP factors. In yeast, the homolog of PIH1D1 was first identified as a direct interactant of NOP58 (Prieto et al., 2015). In human, the N-terminal domain of PIH1D1 called PIH1 domain was described to preferentially bind to highly acidic phosphorylated proteins (von Morgen et al., 2015). A casein kinase (CK2) phosphorylated motif has been identified in

several proteins binding to PIH1D1. A crystal structure of PIH1/Tel2 phospho-peptide has been described and it was shown that serine phosphorylation is absolutely required for binding to a basic pocket in this PIH1 domain (Pal et al., 2014);(Hořejší et al., 2014). A DSDD/E consensus was defined which was also found in a few clients of R2TP. For example, DSDE motif was found in EFTUD2, a specific protein of U5 snRNP and a mutation of Serine to Alanine in this motif prevents the protein to be assembled in U5 particles (Malinová et al., 2017). MRE11, a protein of MRN complex, also has a DSDD motif but another target site for PIH1D1 N-terminal pocket was determined (von Morgen et al., 2017). Two consecutive serines in a stretch of D and E amino acids are also phosphorylated by CK2 in the C-terminal domain of MRE11 and this is required for its stability and its interaction with PIH1D1 (von Morgen et al., 2017). More proteins were also described to bind PIH1D1 N-terminal domain but whether they bind PIH1D1 in a phospho-dependent manner is less clearly defined (von Morgen et al., 2015).

As PIH1D1 appears important in R2TP connection to clients, RPAP3 and HSP90 act to stabilize PIH1D1 (Zhao et al., 2008);(Paci et al., 2012). PIH1D1 is directly bound to RPAP3 but it also interacts with RUVBL1/2 (Muñoz-Hernández et al., 2019). Nevertheless, RPAP3-Cter is essential to hold the R2TP complex together (Martino et al., 2018). It is not defined if RPAP3 directly binds to clients but the strong interaction of RPAP3-Cter to ATPase domains of RUVBL1/2 was proposed to free the HSP90-recruiting region of RPAP3 to adapt to various clients (Martino et al., 2018); (Maurizy et al., 2018). We wondered whether R2TP could recognize several client proteins simultaneously by using interaction domains both on PIH1D1 and RPAP3. In this way, R2TP would then constitute a platform for assembly of multi-molecular complexes. Discovery of new clients recruited by R2TP could be a way to understand the mechanism involved.

In order to define more clients, we had previously performed analysis of the interactome of PIH1D1 N-terminal domain by SILAC-IP. We had identified a list of proteins including known clients of R2TP but also new partners that had not been described to interact with R2TP (Malinová et al., 2017). Among these new partners, TSC1, TSC2 and TBC1D7 are three proteins of a same complex called the TSC complex (Tuberous Sclerosis). TSC complex is a regulator of mTOR activity. TSC1 also called Hamartin is a 130 kDa protein. It was recently shown to interact with HSP90 and to inhibit its ATPase activity (Woodford et al., 2017). TSC2 also called Tuberin is a 200kDa protein. TBC1D7 is the third component of the TSC Complex (Dibble et al., 2012). TBC1D7 has been identified in interaction with TSC1 (Nakashima et al., 2007) and also stabilized by TSC1 (Sato et al., 2010). However, it's molecular function in the TSC complex is not well described. TSC1 was shown to impact the stability of TSC2 by facilitating the HSP90-mediated

folding of TSC2 (Woodford et al., 2017). The C-terminal domain of TSC2 contains a small region of homology with GTPase-activating proteins and TSC1 and TSC2 interact to form a complex acting as a GAP for small G-protein RHEB leading to inactive GDP-RHEB form. GTP-RHEB is an activator of mTOR complex 1 (mTORC1) that stimulates cell growth by promoting protein translation and lipid synthesis (Laplante and Sabatini, 2012). Thus TSC1-TSC2 complex down-regulates mTORC1 activity when it is activated. The activation of TSC1-TSC2 complex occurs through the activation of AKT pathway sensing conditions of low energy or low nutrients whereas in presence of growth factors, this complex is inactivated.

In this work, we try to decipher how the TSC subunits interact with the R2TP complex. The aim is also to define what is the link between R2TP and TSC complex. We asked whether HSP90/R2TP is involved in TSC complex assembly and if TSC subunits can bind independently from each other to the HSP90/R2TP system. We thoroughly characterized a direct interaction of TSC1 with N-terminal domain of PIH1D1. We found that TSC1 and TSC2 are both substrate of HSP90 and we functionally studied the TSC complex assembly in the absence of R2TP.

Materials and methods

Cell culture and plasmid transfection

HeLa Flp-In cells were a gift of S. Emiliani (Institut Cochin, Paris and (Tantale et al., 2016). HEK 293T cells were from the ATCC collection. All cells were grown at 37°C, 5% CO₂ and plasmid transfections were done with JetPrime (Ozyme). HeLa Flp-In and HEK 293T cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), glutamine (2.9 mg/ml), and penicillin/streptomycin (10 U/ml). Cells were regularly tested for mycoplasma contamination. For Label Free or SILAC experiments, HeLa Flp-In cells were co-transfected with Flippase O expression plasmid and pcDNA5-3×FLAG-GFP plasmid fused with protein of interest (PIH1D1 full length protein, PIH1D1_NTER, PIH1D1_NTER_K46A, TSC2) with JetPrime reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Clones were selected in hygromycin B (150µg/ml), picked individually and characterized by Western Blot and fluorescence microscopy. CRISPR/Cas9 knock-out cells were generated by transfection of HEK 293T cells expressing Flag-Cas9 with Sanger Lentiviral CRISPR vector plasmid U6-gRNA/PGK-puro-2A-BFP and guide RNA to the protein of interest (PIH1D1, TSC1) or control locus according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich). Sequences of RNA guides are as following: TSC1-TGAAATAAGGGTGTCTGGTGTG and AGACGAAGTTGCAAGGGTACAT; PIH1D1-CACCGTTGACAGCTACGTCGTAGG and AAACCCTACGACGTAGCTGTCAACC. After selection with puromycin and blasticidin, one single-cell per well was sorted into 96-well plates by FACS for BFP expression, and clones KO for TSC1 were screened either by Western Blot or PCR and sequencing on genomic DNA.

Plasmids and cloning

DNA cloning was performed using standard techniques or with the Gateway™ system (Invitrogen). PIH1D1, RPAP3, TSC1 and TSC2 fragments were generated by PCR and cloned in pDon vector by BP reaction (Gateway). To generate GFP fusions for Label Free or SILAC-IPs, pcDNA5-FRT-GFP-3xFLAG-Rf was recombined with pDon vectors by LR reaction (Gateway). For the LUMIER-IP assays, recombination was done with pcDNA5-FRT-3xFLAG-FL-Rf for the bait, and L30-HA-RL-Rf for the prey. Most of cDNAs were from human origin except for RUVBL1 and RUVBL2 which were from mouse. For Yeast Double Hybrid experiments, baits and prey were transfected in pACTII and pAS2ΔΔ.

Antibodies

Primary antibodies and dilutions for Western Blots were the following: rabbit polyclonal anti-

PIH1D1 (Proteintech 19427-1-AP) at 1:1000, rabbit polyclonal anti-RPAP3 (Sigma SAB1411438) at 1:1000, mouse monoclonal anti-GAPDH (Abcam ab8245) at 1:20000, rabbit monoclonal anti-TSC1 (CST #6935) at 1:1000, rabbit monoclonal anti-TSC2 (CST #4308) at 1:500, mouse anti-Tubulin, (I2G10) at 1:500. Secondary antibodies were goat anti-rabbit and goat anti-mouse coupled to HRP (Sigma).

Western Blot

Proteins were prepared from cell preparation by lysis in cold HNTG buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and protease inhibitors (cOmplete, Roche)) and incubated for 20 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford assay. Protein samples were mixed with Laemmli 2X buffer (4%SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris-HCl) and boiled for 5 min at 95°C. Protein lysates were separated by gradient 4%-15% SDS-PAGE (BioRad) and transferred to a PVDF membrane (Amersham Hybond, GE Healthcare). For western Blot of KO cells, membranes were blocked with 2.5% fat milk (w/v) in TBS with 0.05% Tween and incubated with the appropriate primary antibodies at the appropriate dilution and followed by incubation with secondary antibodies conjugated to HRP. Enzymatic activity was detected using the ECL kit (Roche).

LUMIER IPs

HEK 293T cells were seeded in 24-well plates at 150000 cells per well and transfected with 450 ng of the RL fusion and 50 ng of the 3xFLAG-FFL fusion, with 1 µl of JetPrime (Ozyme), as recommended by the manufacturer and let for 48 h. When treated with CB6644 (Assimon et al., 2019) drug was added 4 h after transfection at 500nM final. Cells were extracted in 500 µl of HNTG containing protease inhibitor cocktail (Roche) and centrifuge at 4°C and at 3220xg for 5 min. For IP, a high-binding 96-well plates (Lumitrac, High binding, Greiner 655074) was coated with 70 µl of M2 anti-FLAG antibody (10 µg/ml in 1× PBS; F1804 Sigma-Aldrich) and incubated overnight at RT in the dark. The next day, wells were blocked with 300 µl of blocking buffer (3% BSA, 5% sucrose, 0.5% Tween 20, 1× PBS), for 1 h at RT. 100 µl of each extract were dispatched in two wells, one for control without antibody and one with anti-FLAG antibody. Plates were incubated 3 h at 4°C and wells were washed 5x10 min with 300 µl of ice-cold HNTG. After the last wash, 10 µl of PLB buffer (Promega) was added in each well. To measure the signal in the input, 2 µl of extract and 8 µl of PLB buffer was put in empty remaining wells. Plates were then incubated 5min at RT, and FL and RL luciferase activities were measured in IP and input wells, using the dual luciferase kit (Promega). Every transfection was performed at least twice as independent replicates.

In experiments done with HEK 293T KO clones, each transfection was done in parallel in KO cells and control B3-cells. When cells are treated with CB6644, drug is added 4 h after transfection at 500 nM and let for 48 h. Co-IP efficiency was defined as the RL/FL ratio in the pellet, divided by the RL/FL ratio in the input. Unless otherwise stated, statistical significance was evaluated using Student's t-test assaying whether the co-IP efficiency in the anti-FLAG IP was more than 6 times higher than the mean values obtained in the control IP, done without antibodies (Maurizy et al., 2018).

For lambda phosphatase assay, after IP and before wash steps, extracts were treated with 1000U of Lambda Protein Phosphatase (NEB P0753) or only its Buffer (10X NEBuffer Protein MetalloPhosphatases (PMP) and 10 mM $MnCl_2$) following manufactured protocol for 30 min at 30°C. Statistical tests were done with Open Office.

Luciferase assays

HEK 293T cells were grown on 24-well plates and co-transfected with 50 ng of plasmid expressing a 3XFLAG-tagged Firefly luciferase alone (3xFLAG-FL) and 450 ng of plasmid coding Renilla luciferase (RL) in fusion with the protein of interest with 1 μ l of JetPrime (Ozyme). After 48h, cells were extracted in 100 μ l of PLB buffer (Promega) and incubated at 4°C for 15 min. RL and FL activities were measured on 96-well plates using 4 μ l of cell extract and the dual-luciferase assay kit (Promega). Values obtained for RL were normalized to FL values. Each experiment was done in duplicate and repeated two times for statistics. When treated with Geldanamycin (GA, Sigma G3381), drug was added 16 h before extraction at 2 μ M final. Statistical tests were done with Open Office.

SILAC labeling and proteomic analysis

HeLa Flp-In cells were grown for 15 days in each isotopically labeled media (CIL/Eurisotop), to ensure complete incorporation of isotopically labeled arginine and lysine (light label (R0K0, L) or semi-heavy label l-lysine-2HCl (2H4, 96–98%)/l-arginine-HCl (13C6, 99%) (R6K4, M) or l-lysine-2HCl (13C6, 99%; 15N2, 99%)/l-arginine-HCl (13C6, 99%; 15N4, 99%) heavy label (R10K8, H) (percentages represent the isotopic purity of the labeled amino acids). Eight 15-cm diameter plates were used per SILAC condition. Cells were rinsed with PBS, trypsinized and cryogrinded (Domanski et al., 2012) and powder was resuspended in HNT lysis buffer (20mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% triton X-100, protease inhibitor cocktail (cOmplete, Roche)). Extracts were incubated 20 min at 4°C and clarified by centrifugation for 10min at 20 000xg. Extracts were pre-cleared by incubation with Protein G Sepharose beads (GE healthcare) for 1 h at 4°C. The control was extracted from the SILAC light condition prepared from parental HeLa cells that did not

express the GFP fusion. Each extract was then incubated with 50µl of GFP-Trap beads (Chromotek) for 1.5 h at 4°C, washed 5 times with HNT buffer, and beads from the different isotopic conditions were finally pooled. Bound proteins were eluted by adding 1% SDS to the beads and boiling for 10 min. Proteomic analysis was performed as previously described (Maurizy et al., 2018).

Yeast two-hybrid assay

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

Cytometry for cell cycle analysis

Cells were collected by trypsinization and resuspend in medium containing serum to inactivate trypsin. Then cells were centrifuged at 200xg for 6 min at RT. Supernatant was removed and cells resuspended in 1mL of cold PBS. Cells were gently vortexing and slowly adding to 9 mL of 70% cold ethanol in a polypropylène falcon tube. Cells were then stored at 4°C for at least 2h before being centrifuged 10 min at 200xg at 4°C. Pellet was resuspend in 3mL of cold PBS and centrifuge again 10 min at 200xg at 4°C. Pellet was resuspend in 500 µl of Propidium Iodide (PI)/Triton 100X staining solution. Cells were incubated at 37°C for 15 min before to come back on ice and being protected from light. Data were acquired on Novocyte flow cytometer with a 488 nm excitation laser and analysis was done with NovoExpress.

Results

A well described phospho-binding pocket in PIH1D1 N-terminal domains associates with subunits of TSC complex

PIH1D1 is a well described client-binding factor of R2TP. Its N-terminal domain (PIH1D1_NTER, 1-180AA) also called PIH domain is a binding domain for phosphorylated peptides with a DSDD/E consensus (Hořejší et al., 2014) (described in Figure 1A). In order to better study clients binding to this domain, we performed a label-free proteomic study of PIH1D1 and PIH1D1_NTER partners. We wanted to determine to which extent the phospho-binding pocket previously defined is determinant for interaction with PIH1D1. To do so, we also performed proteomic study of partners of a mutant form of PIH1D1_NTER called PIH1D1_NTER_K64A. This mutation prevents binding of phospho-peptides such as one found in TEL2 with a DSDD/E consensus sequence (Hořejší et al., 2014). HeLa Flp-In cell lines were generated expressing GFP fusions of these proteins or fragments and we performed anti-GFP IPs. R2TP factors RPAP3, RUVBL1 and RUVBL2 were strongly enriched in the PIH1D1 IP and not detected in the PIH1D1_NTER IP as expected (Figure 1B). This was also the case for R2TP co-factors such as ZNHIT2, NOPCHAP1 and prefoldin-like complex all found in the PAQosome as well as HSP90 subunits. Clients proteins of R2TP were also found in PIH1D1 IP (Table S1) but some of them were better enriched with PIH1D1_NTER. This is the case of core protein of box H/ACA snoRNP NHP2 and core proteins of box C/D snoRNP such as SNU13, NOP58 and FBL and also POLR2E from RNA polymerase II complex (Figure 1B). New proteins were also detected in PIH1D1_NTER IP (Table S2). A good enrichment was observed for the three subunits of Tuberous Sclerosis complex (TSC: TSC1, TSC2 and TBS1D7) in this IP as they were not detected in PIH1D1 full length IP. Among these proteins well detected in PIH1D1_NTER IP, a lot of them were not detected in PIH1D1_NTER_K64A IP (Table S3). This is the case for TEL2 and this was expected but this is also the case for snoRNP proteins, POLR2E, as well as TSC subunits (Figure 1C). These data suggest that the phospho-binding pocket of PIH1D1_NTER is determinant for interaction with well known R2TP clients and also with TSC subunits.

***In vivo* interaction of TSC1 and TSC2 proteins with PIH1D1-Nterminal domain**

In order to define which of the TSC complex subunits are able to bind PIH1D1 or its fragment, we used LUMIER IP, which is a quantitative immunoprecipitation assay using pairs of over-expressed proteins (Barrios-Rodiles et al., 2005). PIH1D1, PIH1D1_NTER and PIH1D1_NTER_K64A were fused to FLAG-tagged Firefly luciferase (3xFLAG-FL). The three

subunits of TSC complex were fused to Renilla luciferase (RL). We then measured FL and RL activities in the input and after IP with anti-FLAG antibodies or without antibody as control. Co-IP efficiency was then defined as the IP/input ratio of RL relative to that of FL. RPAP3 and TEL2 were also fused to RL for a positive control. RPAP3 was only interacting with PIH1D1 and TEL2 was interacting to a significant level with both PIH1D1 and PIHD1_NTER (Figure 2A). ALIX was used as a negative control. A significant interaction was observed for TSC1 with PIH1D1 and PIH1D1_NTER but very faint interaction was found for TSC2 (Figure 2A). We found a stronger interaction of TSC2 with RPAP3, RUVBL1 and RUVBL2 in others LUMIER IP assays (Figure 4E, S2 and S3, see below) suggesting that TSC2 interaction with R2TP could involve several subunits of the complex and testing TSC2 interaction with PIH1D1 would not give a strong interaction. TBC1D7 showed a % of efficiency similar to negative control ALIX for all three baits (Figure 2A). This suggests that this subunit of TSC complex does not interact at all with PIH1D1. The mutation K64A in the PIH1D1-NTER alters TSC1 binding. This confirmed what was observed in our proteomic study. TSC1 would thus be the only TSC complex subunits strongly binding to PIH1D1 and this would involve the phospho-binding pocket of PIH1D1 N-terminal domain.

In order to determine the region of TSC1 that is responsible for its interaction with PIH1D1_NTER, we prepared truncated mutant of TSC1, each spanning the different interaction domains that have been described in the literature for this protein (N-terminal domain: (Mozaffari et al., 2009); TSC2 binding domain (Santiago Lima et al., 2014); (Hodges et al., 2001); (Coiled-coil domain (Hoogeveen-Westerveld et al., 2010); (TBC1D7 binding domain: (Gai et al., 2016); (HSP90 binding domain : (Woodford et al., 2017). Four domains have thus been defined (TSC1_D1-D4, figure 2B) and fused to RL in order to test their interaction in LUMIER IP with PIH1D1 and PIH1D1_NTER fragment wild type or mutant (Figure 2C). The domain 3, which contains a Coil-Coiled domain (CCD) involved in TSC1 dimerization was the only fragment showing a strong interaction with both PIH1D1 and PIH1D1_NTER. This interaction was strongly reduced when mutant PIH1D1-NTER_K64A was used as a bait. PIH1D1_NTER also slightly interacts with D4 domain of TSC1 which also contains the CCD but this is reduced compared to D3. This suggests that CCD domain would be involved in interaction with PIH1D1_NTER but several amino acids upstream of the CCD would also reinforce the interaction. We also studied if truncated mutants of TSC2 were able to show an interaction with PIH1D1 in LUMIER IP. Four domains of TSC2 (TSC2_D1-D4) have been generated and they showed no interaction with PIH1D1, PIH1D1_NTER wild type or mutant in LUMIER IP (Supplemental Figure 1A and 1B). To confirm these data, TSC1 and TSC2, as well as truncated mutants of TSC1 were also tested for interaction with PIH1D1 and PIH1D1 NTER fragments by two-hybrid assays (Supplemental Figure

1C). TSC1 and TSC1_D3 were found to interact with PIH1D1 under 3AT to a concentration that prevent binding to a negative control ALIX. This occurred when PIH1D1 was in fusion with the GAL4 DNA binding domain in PAS2 ∞ plasmid. Moreover, using PIH1D1_NTER with GAL4 DNA binding domain and 1 M 3AT, TSC1_D3 showed a very strong interaction confirming the ability of TSC1_D3 to directly interact with PIH1D1_NTER. This binding was much less detected when PIH1D1-NTER_K64A mutant was used instead of wild type. All these data suggest the involvement of the well described basic pocket of PIH1D1-NTER in the interaction with TSC1 and this interaction could occur through a domain containing Coiled-coil domain (amino acids 688-998).

Two-hybrid assays had also allowed the detection of an interaction between TSC1 and RUVBL1 when RUVBL1 was fused to GAL4 DNA binding domain. For TSC2, no interaction was found with the four subunits of R2TP by this method. Nevertheless, we were able to find interaction of TSC2 with other subunits of TSC complex as described previously(Santiago Lima et al., 2014).

Non-canonical direct interaction of TSC1 with PIH1D1_NTER

If TSC1 could use the phospho-binding pocket to interact with PIH1D1, it is not clear if the peptide sequence of TSC1 binding to this pocket is phosphorylated. Many phosphorylation sites have been described for TSC1 and TSC2 that are regulated according to growth conditions of the cells (Huang and Manning, 2008). We thus decided to perform a proteomic analysis of phospho-peptides pelleted in the PIH1D1 and PIH1D1_NTER IPs. This was done in duplicates and the mean number of peptides after TiO₂ column purification is given in Figure 3A (red bars are for phospho-peptides and black bars for total one before purification). The number of phospho-peptides was very high in PIH1D1_NTER IP compared to PIH1D1 and control. Analysis of these phospho-peptides did not show DSDD/E consensus sequence as expected. This experiment allowed to identify new phosphorylation sites on known partners of PIH1D1 (Figure 2B). Ser 836 in C-terminal of TEL2 was identified. For TSC1, we detected only one phosphorylation for Ser 505. TSC2 showed three phosphorylations on Ser 422, 981, and 1254. Ser 981 was described to be phosphorylated by AKT (Inoki et al., 2002);(Manning et al., 2002);(Potter et al., 2002) and Ser 1254 by MAPKAP Kinase 2 (MK2) (Li et al., 2003) and they favor interaction with 14-3-3. This interaction is described to play a role in TSC2 localization and degradation (Li et al., 2003).

We wondered whether the phosphorylation of TSC1 and TSC2 could be required for their interaction with PIH1D1-NTER. To test this possibility, we performed LUMIER IP and subsequently treated pellets after 3XFLAG-FL-PIH1D1_NTER IP with lambda phosphatase

(Figure 3C). We used TEL2 as a control prey and found a decrease in % of efficiency when lambda phosphatase was added. Doing the same experiment with TSC1 and TSC2 as preys showed no difference between treated and non-treated conditions even for the very strong interaction of TSC1 with PIH1D1_NTER. This indicates that the phosphorylation of TSC1 and TSC2 could be dispensable for their interaction with PIH1D1_NTER. We also tested domains D3 and D4 of TSC1 in this experiment and this showed that none of the two domains is significantly dependent on phosphorylation for its interaction with PIH1D1_NTER (Figure 3C). Moreover, we did not find a peptide that would correspond to this position in our phospho-proteomic study. We then decided to turn to *in vitro* assay to study if direct interaction of TSC1 with PIH1D1_NTER can occur with recombinant proteins. We used a co-expression assay in E. Coli. We were able to produce *in vitro* a soluble fragment of TSC1 fused to HIS (725-1047). This fragment was able to pull-down PIH1D1_NTER (1-180) (Figure 3D). These data suggest that the TSC1 fragment (725-1047) directly interacts with PIH1D1_NTER in absence of phosphorylation and it thus binds to the well described basic pocket of PIH1D1_NTER in a non-canonical manner.

TSC1 and TSC2 are clients of HSP90

TSC2 was recently shown to be folded by HSP90 and TSC1 was proposed to stabilize TSC2 (Woodford et al., 2017). We tested the dependency of HSP90 for the stability of both proteins. We expressed RL fusion of TSC1 and TSC2 in HEK 393T cells and measured the level of luciferase in cells treated with Geldanamycin, an inhibitor of HSP90, compared to non-treated cells (Figure 4A). We found a decrease of both TSC1 and TSC2 level in treated cells as it was already observed for NOP58 (Boulon et al., 2008). This shows that HSP90 is involved in stabilizing both TSC1 and TSC2. The interaction of TSC1 with HSP90 has already been described (Woodford et al., 2017). To study the interaction of TSC2 with HSP90, we performed a SILAC proteomic study of GFP-TSC2 IP (Figure 4B). TSC1 was the major partner of TSC2 detected and chaperone HSP70 and HSP90 chaperones were also enriched with their co-chaperone BAG2 and STIP1. No R2TP subunit was detected in this IP. This could be due to the transient nature of the association. As no subunit of R2TP was found in this IP, we wanted to test TSC2 association with R2TP subunits by LUMIER IP. The stronger binding was obtained with RPAP3 fused to 3XFLAG-FL and TSC2 fused to RL (Figure 4E). RPAP3 is a direct partner of HSP90 and we wondered which domain of RPAP3 could bind to TSC2 and if it is dependent on HSP90 (Figure 4C). RPAP3_CTER is a functional domain bound to RUVBL1/2 (Maurizy et al., 2018) and RPAP3-TPR (133-396) is the domain binding to chaperones HSP70 and HSP90. We also cloned the same fragment with a double mutation (N172A in TPR1 and N321A in TPR2) in the two TPR domains that prevents binding to HSP90 (Henri et al., 2018). When fused to 3xFLAG-FL, RPAP3_CTER and RPAP3_TPR were immunoprecipitated

with TSC2 fused to RL and binding was reduced two-fold when TPR was mutated showing the role of HSP90 in the interaction of TSC2 with RPAP3. We also showed an interaction of TSC2 with RUVBL1 and RUVBL2 (Figure 4E). All these data suggest that while HSP90 favors interaction of TSC2 with RPAP3, it could also involve other members of the R2TP complex and PIH1D1 would not be the only factor involved in TSC subunit recognition.

TSC2 interacts with HSP90/R2TP in a TSC1 independent manner

To study if TSC2 is able to interact with HSP90/R2TP in the absence of TSC1, we knocked out TSC1 in HEK 293T cells by CRISPR/Cas9 editing method. Total depletion of TSC1 in the two homozygote clones generated has no impact on the level of TSC2 as seen by Western blot, neither it affected PIH1D1 and RPAP3 level (Figure 4D). By LUMIER IP, we compared interaction of R2TP subunits with TSC2 between TSC1 depleted cells and parental cells. TSC2 fused to RL showed an interaction with all subunits of R2TP in parental cells. Among all the 3XFLAG-FL fusions, RPAP3 had the stronger interaction with TSC2-RL but PIH1D1 and RUVBL1 or RUVBL2 also showed a little interaction (Figure 4E). When the same experiment was done in TSC1 KO cells, levels of interaction did not change excepted for PIH1D1 which showed a little increase of association with TSC2-RL. Doing the experiment with TSC2 fused to 3XFLAG-FL as a bait showed a very low interaction with all R2TP subunits fused to RL and these interactions were not changed when experiment was performed in TSC1 KO cells (Supplemental Figure 3). These data are in favor of an interaction of TSC2 with R2TP that does not depend on the presence of TSC1. Thus, TSC1 and TSC2 could be recruited independently from each other by the R2TP complex before they become assembled in a complex.

TSC2 interacts with HSP90/R2TP in a PIH1D1 independent manner

To better characterize the subunits of R2TP involved in TSC2 binding, we knocked out PIH1D1 in HEK 293T cells by CRISPR/Cas9 editing method. These clones showed absence of PIH1D1 by Western blot but RPAP3 was equally expressed in PIH1D1 KO clones compared to parental cells (Figure 5A). We decided to use these KO clones to study the interaction of TSC2 with RPAP3 and RUVBL1 and 2 by LUMIER IP (Figure 5B). In parental cells, RPAP3 fused to 3FLAG-FL showed the strongest interaction with TSC2 fused to RL but RUVBL1 and 2 also interacted to a significant level. When the experiment was performed in PIH1D1 KO cells, the association of TSC2 with RPAP3 was increased and this was also observed to a lesser extend with RUVBL1. We also found a little increase of TBC1D7 fused to RL with RPAP3 in this experiment. When put together, our data suggest that TSC2 can be taken in charge by HSP90, RPAP3 and maybe RUVBL1/2 complex. Nevertheless, a full functional R2TP with PIH1D1 would be required for complete release of TSC

subunits from chaperoning complex.

HSP90/R2TP favors the assembly of TSC complex

To test the hypothesis that HSP90/R2TP system is involved in the assembly of TSC complex, we studied the association of TSC1 with TSC2 in LUMIER IP in PIH1D1 KO clones compared to parental cells (Figure 6A). We had found a significant decrease of the interaction between TSC1 fused to RL and TSC2 used as a bait with 3XFLAG-FL fusion PIH1D1 KO cells compared to parental cells. TBC1D7 was not associated enough with TSC2 in this assay to find a difference between the two conditions. There is also no significant difference when TSC1 was used as a bait by fusing it with 3XFLAG-FL and tested with TSC2-RL. Nevertheless, we were able to find a decrease of association of TSC2 with TSC1 as a bait when inhibitor CB-6644 was used to inhibit RUVBL1/2 activity (Assimon et al., 2019) in HEK 293T (Figure 6B). Inhibition of RUVBL1/2 activity also reduced the association of TSC1 in an assay where TSC2 was used as a bait (Figure 6C). Nevertheless, no cumulative effect of RUVBL1/2 activity inhibition with PIH1D1 depletion was observed (Figure 6 B and C). These data show the functional involvement of R2TP in the assembly of the TSC complex, especially to promote TSC1-TSC2 interaction.

Funding

This work was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS); *Université de Montpellier* (UM); *Université de Lorraine* (UL); the *Agence Nationale de la Recherche* [ANR-16-CE11-0032-04]; grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer ('équipe labellisée'); Institut national du Cancer [INCa PLBio 2016-161]. CA was supported by La ligue Contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale.

Acknowledgment

We thank PPF, MRI and MGC facilities of UMS Montpellier BioCampus. We thank C. Goujon for the gift of HEK 293T cells expressing Cas9 and Y. Abel for cloning of PIH1D1 KO cells. We thank B. Pradet-Balade, D. Helmlinger and P. Marin for their discussion on the project and M. Hourques and D. Soumayla Seyni for their help in Y2H and IP LUMIER assays. We also thank S. Boulon for reading of the manuscript.

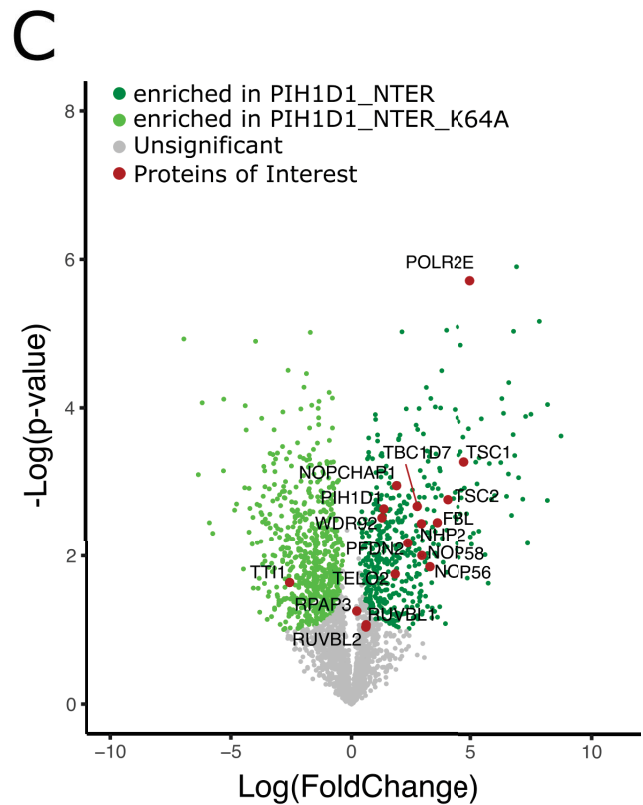
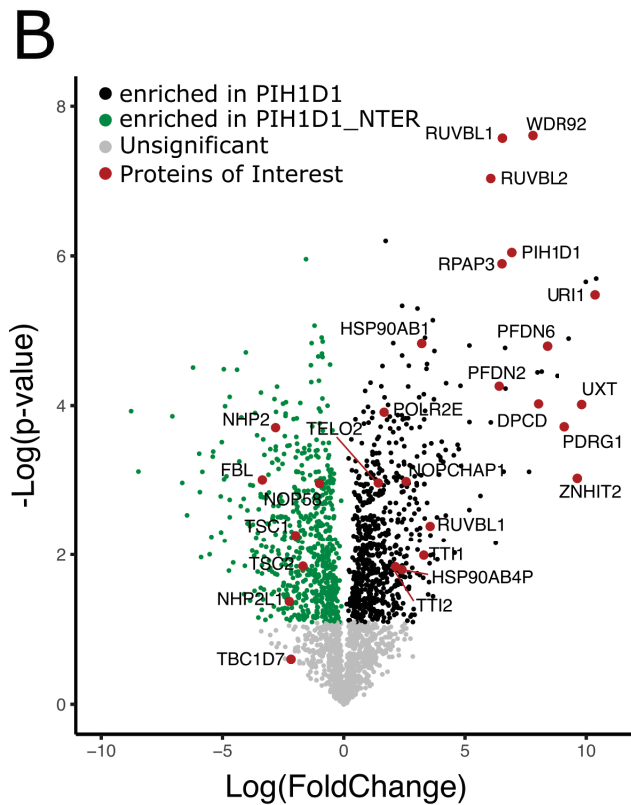
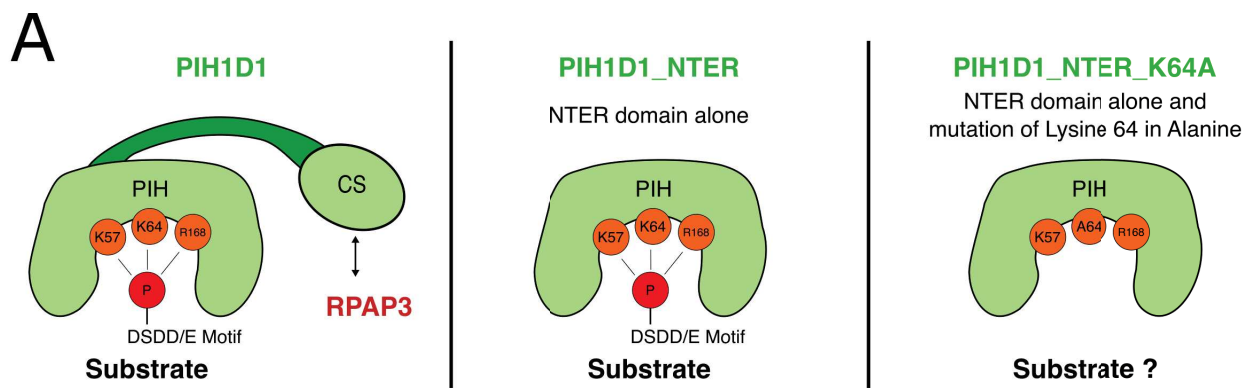


Figure 1

Figure 1. Label-free proteomic analysis of GFP-PIH1D1, GFP-PIH1D1_NTER and GFP-PIH1D1_NTER_K64A IP partners.

(A) Schematic representation of the human PIH1D1 structural domains showing the interaction of PIH1D1_NTER domain with a consensus motif found in some of its binding partners. PIH1D1_NTER (1-180) is constituted of a PIH domain that contains a phospho-binding pocket made of basic amino acids which can bind a DSDD/E motif with the serine phosphorylated by CK2 (Hořejší et al., 2014). PIH1D1 full length (a) and PIH1D1_NTER (b) were used as baits for label-free proteomic studies after IP. A mutant K64A in PIH1D1_NTER was also generated (c). This mutation was described to abolish binding to TEL2 (Hořejší et al., 2014). (B and C) Label-free proteomic analyses after IP of GFP-PIH1D1, GFP-PIH1D1_NTER and GFP-PIH1D1_NTER_K64A. Experiments were done in duplicates for each bait and for the control IP done in parental HeLa cells. The graph displays $\text{Log}_2(\text{pvalue})$ (y axis) as a function of $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ (x axis) when comparing PIH1D1 versus PIH1D1_NTER (B, black dots: proteins enriched in PIH1D1 IP, green dots: proteins enriched in PIH1D1_NTER IP) or PIH1D1_NTER versus PIH1D1_NTER_K64A (C, green dots: proteins enriched in PIH1D1_NTER IP, light green dots: proteins enriched in PIH1D1_NTER_K64A IP).

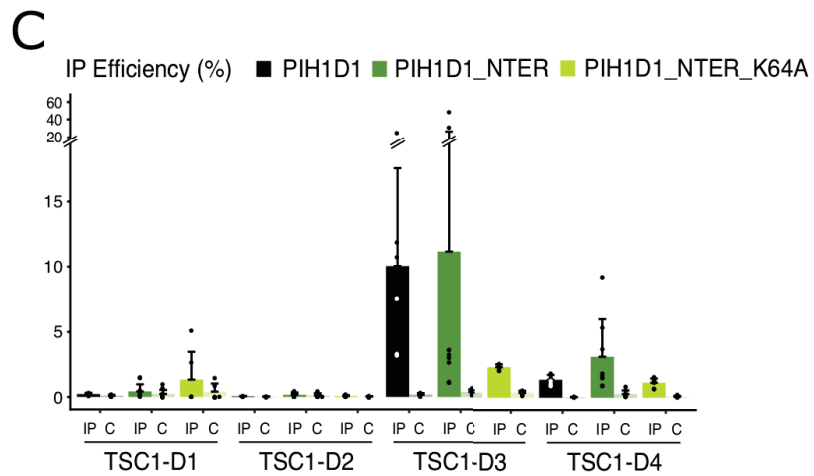
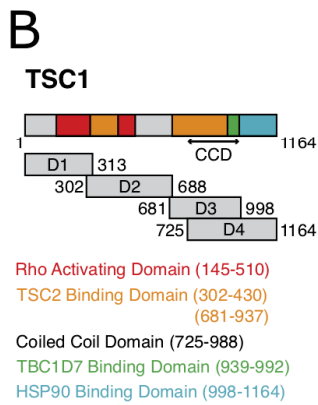
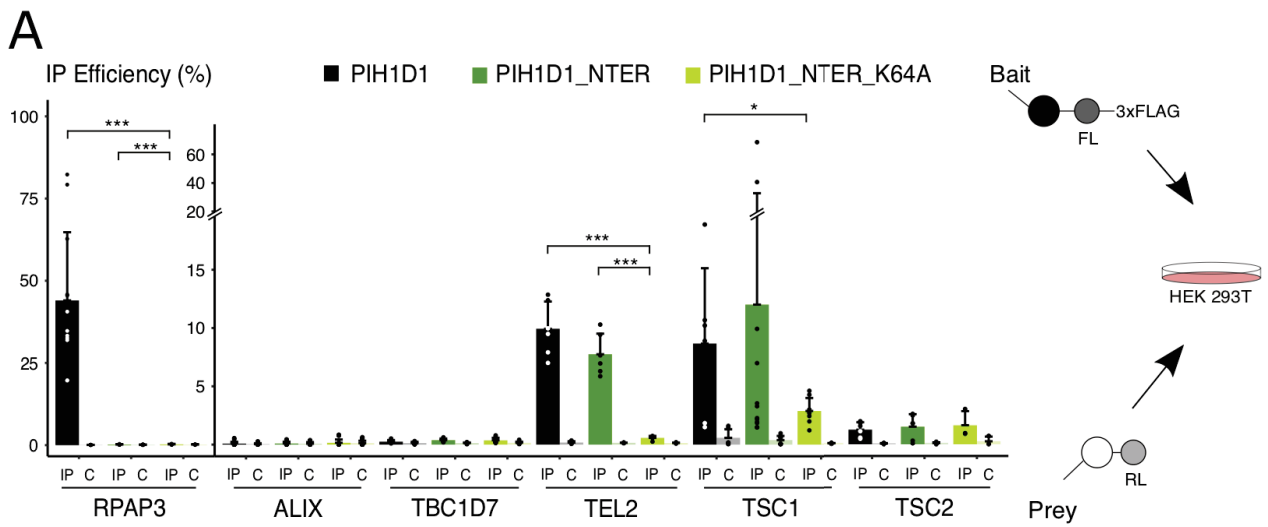


Figure 2

Figure 2. Differential interaction of TSC1 with PIH1D1 and WT and mutant PIH1D1_NTER.

(A) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between PIH1D1, PIH1D1_NTER and PIH1D1_NTER_K64A fused to 3XFLAG-FL and TSC complex subunits fused to RL. TEL2 and ALIX fused to RL were used as positive and negative controls respectively. HEK 293T cells were co-transfected with a plasmid coding for the bait (color code indicated on the top of the graph) and a plasmid coding for the prey (indicated below the graph) and anti-Flag IP is performed after 48 h. The graph plots the IP efficiency (%). It measures the co-precipitation of the RL fusion proteins (RL IP/Input), normalized by the amount of FL fusion immunoprecipitated (FL IP/Input) obtained in a 96-well plate with anti-FLAG antibody and the extract from cells transfected with the indicated plasmids. C is the IP efficiency with the same extract but in a control well without antibody. Bars represent means of 4 or 5 experiments. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly different with *** = p-value < 0.001; * = p-value < 0.05 (Student T-test). (B) Schematic architecture of human TSC1. Known domains of TSC1 described from the literature are represented with different colors and named below the drawing. CCD is for Coil-Coiled domain. Truncated mutants D1-D4 were generated that contains these different domains (numbering corresponds to amino-acids). (C) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between PIH1D1, PIH1D1_NTER, PIH1D1_NTER_K64A fused to 3XFLAG-FL and TSC1 truncated mutants fused to RL. Legend as in A.

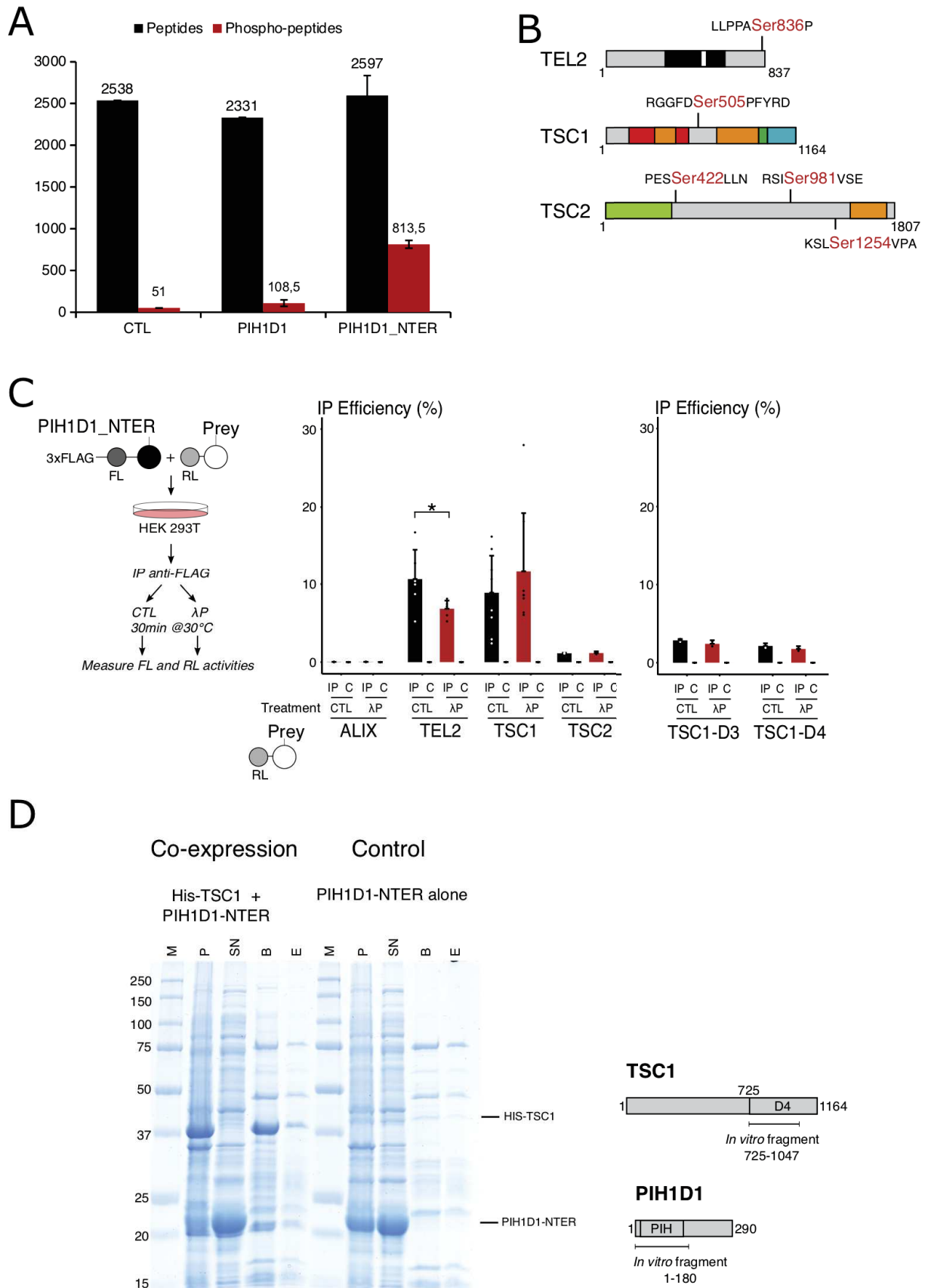


Figure 3

Figure 3. Phospho-proteomic study of PIH1D1 and PIH1D1_NTER IP and evidences that TSC1 interacts with PIH1D1_NTER both *in vivo* and *in vitro*

(A) Peptides and phospho-peptides detected in proteomic analysis of GFP-PIH1D1 or GFP-PIH1D1_NTER IP. CTL IP is performed with parental HeLa cells. Bars represent means of number of peptides (n=2, black bars: total peptides, red bars: phospho-peptides). (B) Schematic view of phospho-peptides detected for TEL2, TSC1 and TSC2. Peptide sequence are in black and phosphorylated serines in red. (C) LUMIERIP showing *in vivo* interactions between PIH1D1_NTER fused to 3XFLAG-FL and TEL2, TSC1, TSC2, TSC1_D3, TSC1_D4 fused to RL in assays treated or not with lambda phosphatase after IP. ALIX fused to RL was used as a negative control of IP and TEL2 fused to RL as a positive control for lambda phosphatase effect. Left panel: schematic representation of the assay. Middle and right panels: graphs plotting the IP efficiency of the indicated proteins. Black bars are means of measures without lambda phosphatase (CTL) and red bars with lambda phosphatase (IP) (n=5 or 6). Error bars: standard deviation. Stars: values significantly different with ** = p-value < 0.01; * = p-value < 0.05 (Student T-test). (D) Coomassie-stained SDS-PAGE 10% of His-TSC1 (725-1047) co-expressed with PIH1D1_NTER (1-180) in *E. coli* and purified on TALON resin. PIH1D1_NTER alone does not bind on resin (Control). From left to right for the two parts of the gel (Co-expression and Control): M: size of the markers in kDa; P: pellet; SN: soluble fraction; B: bound on resin; E: imidazole eluate. The position of the fragments after migration are shown on the right of the gel and a drawing of the two proteins indicates the edge of the fragments expressed.

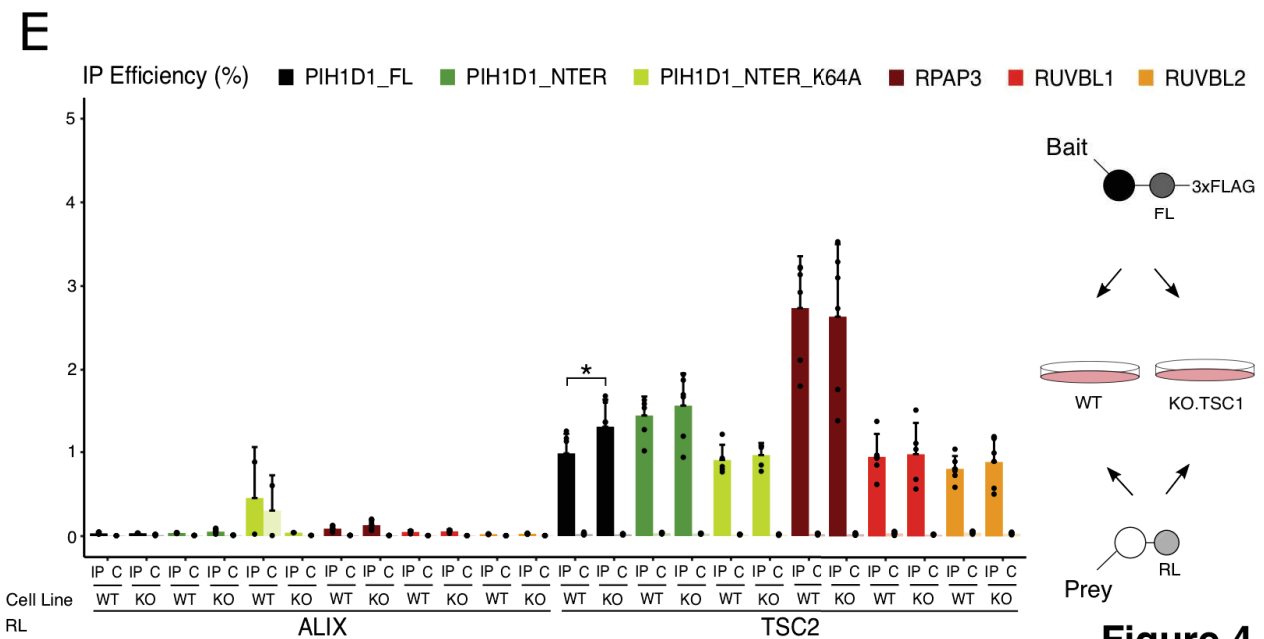
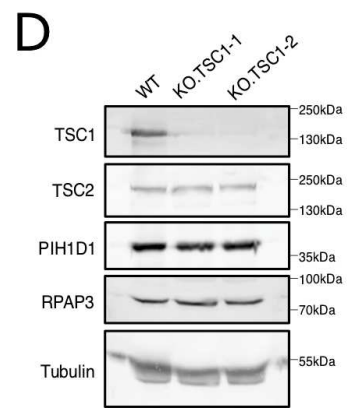
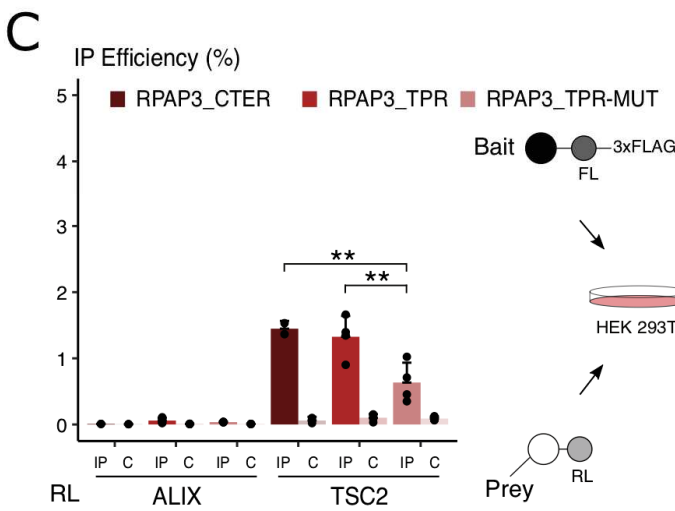
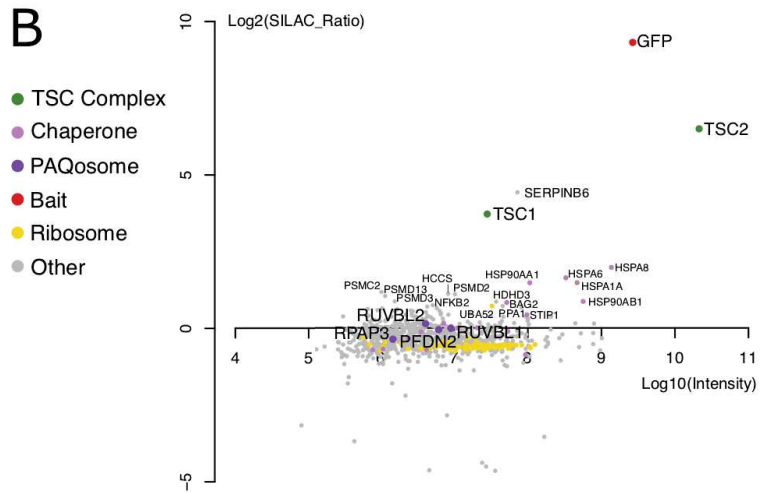
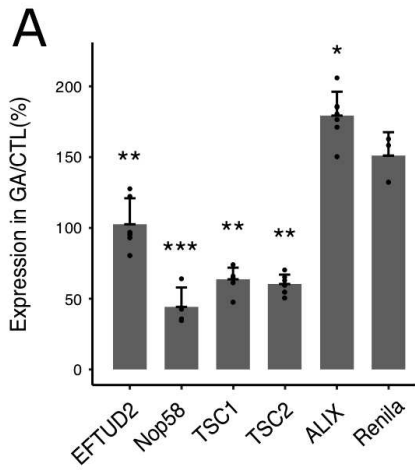


Figure 4

Figure 4. Role of HSP90 for the stability of TSC1 and TSC2 and TSC1 independent interaction of TSC2 with R2TP

(A) Stability of proteins upon HSP90 inhibition. Bars represent average expression level proteins indicated below the graph measured by luminescence after inhibition of HSP90 with geldanamycin (GA) compare to non-treated condition (% of expression of RL level in cells after GA treatment compared to non-treated cells, n=5). HEK 293T cells co-transfected with plasmids coding each RL-protein and a pCMV-FL plasmid used to normalize. EFTUD2, ALIX and Renilla were used as negative controls. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly different with *** = p-value < 0.001; ** = p-value < 0.01 (Student T-test). (B) SILAC IP proteomic analysis of GFP-TSC2. The graph depicts the log₂ of SILAC ratio (y axis) as a function of log₁₀ of intensity (x axis). Stable HeLa cells expressing GFP-TSC2 were used for IP and parental cells for control IP. Each dot is a protein and the color code is indicated below the graph. (C) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between RPAP3_CTER, RPAP3_TPR and RPAP3_TPR-MUT fused to 3XFLAG-FL with TSC2 fused to RL. Legend as in Figure 2A. Stars: values significantly different with ** = p-value < 0.01 (Student T-test). (D) Protein level detected by Western Blots with HEK 293T parental cell extract (WT) and two TSC1 KO clone extracts (KO.TSC1-1 and KO.TSC1-2). Proteins detected are indicated on the left and marker molecular weight on the right of each blot. Tubulin is used as a loading control. (E) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between R2TP subunits fused to 3XFLAG and TSC2 fused to RL in both WT or KO-TSC1 cells. Legend as in Figure 2A. Stars: values significantly different with * = p-value < 0.05 (Student T-test).

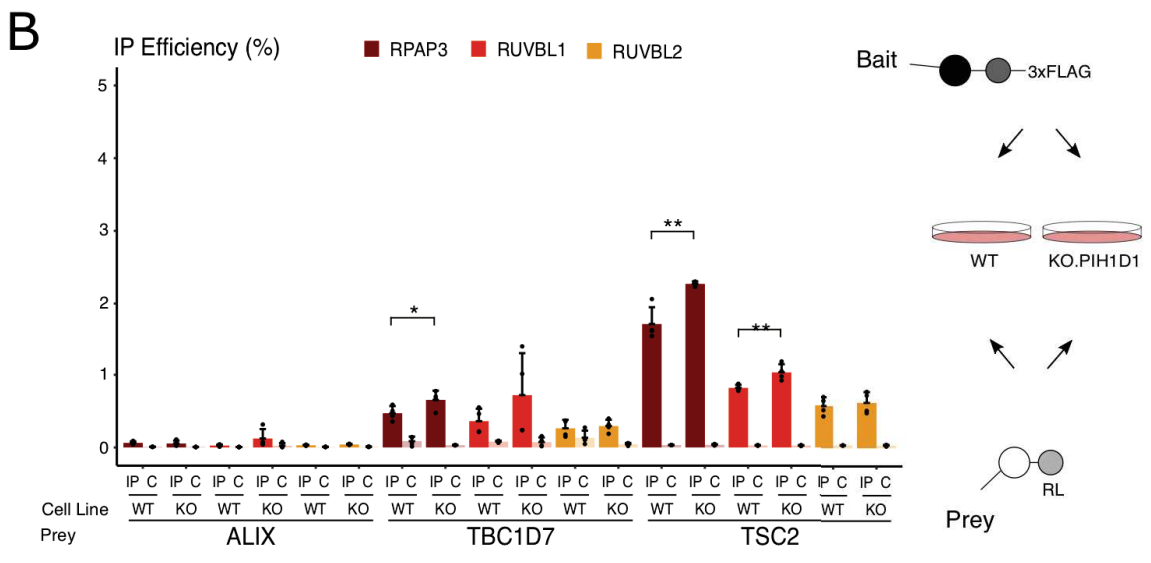
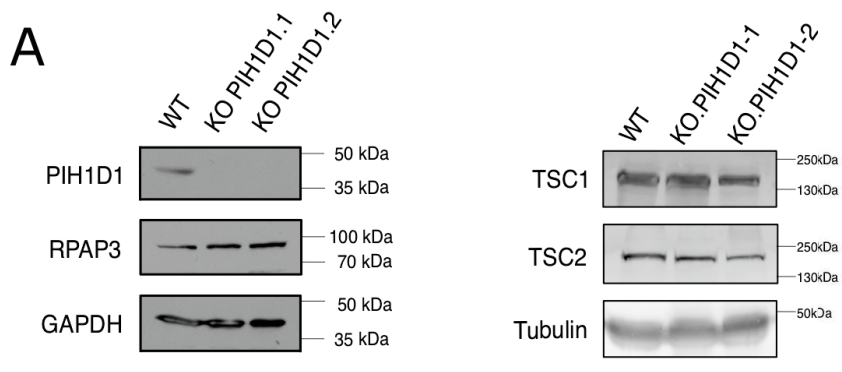


Figure 5

Figure 5. PIH1D1 independent interaction of TSC2 with R2TP subunits.

(A) Protein level detected by Western Blots with HEK 293T parental cell extract (WT) and two PIH1D1 KO clone extract (KO.PIH1D1-1 and KO.PIH1D1-2). Proteins detected are indicated on the left and marker molecular weight on the right of each blot. Tubulin is used a loading control. (B) LUMIER IP showing interaction between R2TP subunits fused to 3XFLAG and TSC2 or TBC1D7 fused to RL in both WT or KO-PIH1D1. Right panel: schematic representation of this assay. A color code indicates proteins used as baits. Left panel: graph plotting the IP efficiency of the indicated proteins. ALIX fused to RL was used as a negative control. C is for control without antibody. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly different with ** = p-value < 0.01; * = p-value < 0.05 (Student T-test).

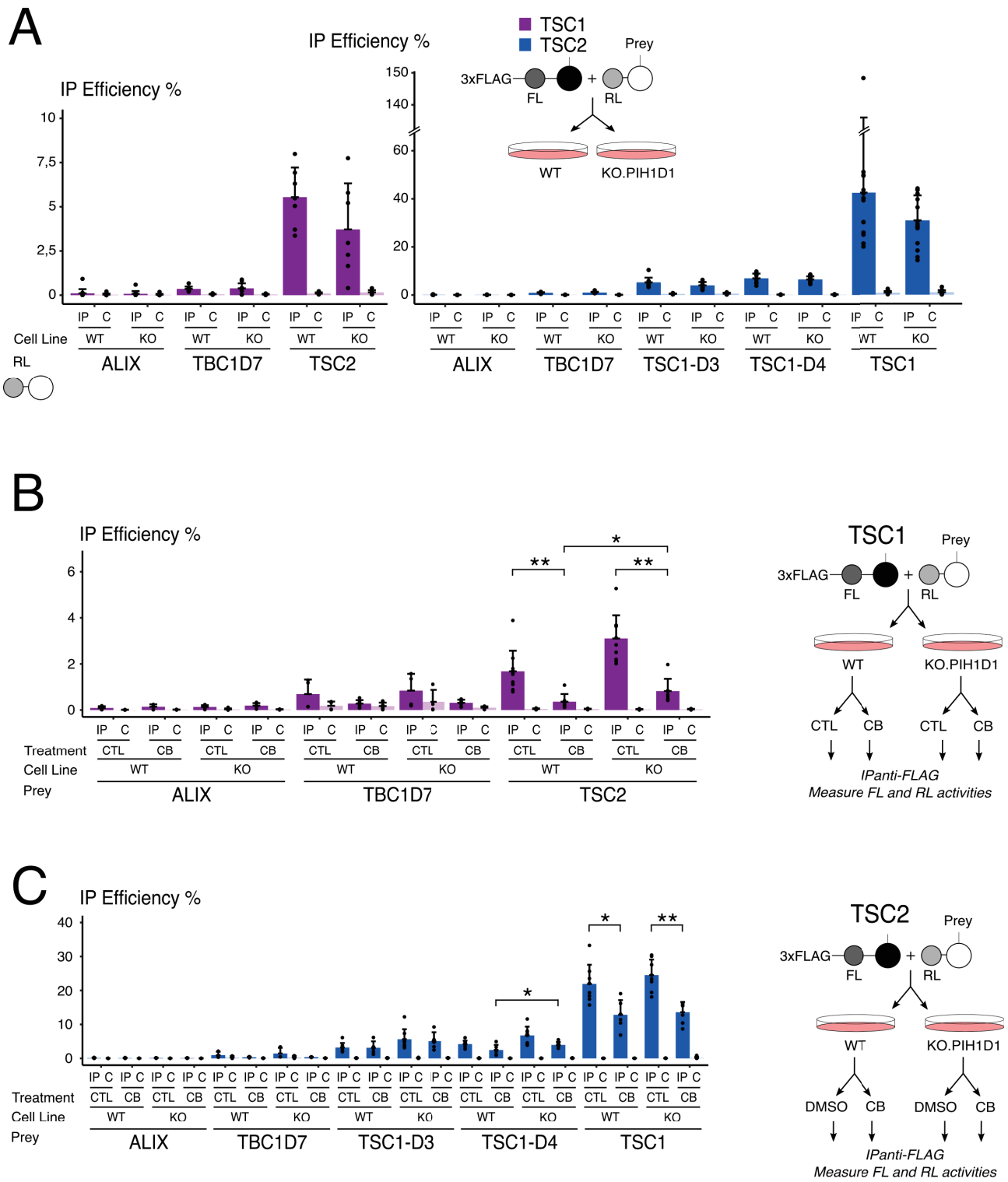


Figure 6

FIGURE 6. The absence of PIH1D1 and the inhibition of RUVBL1/2 decrease the interaction between TSC1 and TSC2.

(A) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between TSC subunits in presence (WT) or absence of PIH1D1 (KO). Top panel: schematic representation of this assay and color code for the baits used. Transfection was done on WT or KO cells. Left panel: graph plotting the IP efficiency of TSC1 fused to 3XFLAG-FL. Right panel: graph plotting the IP efficiency of TSC2 fused to 3XFLAG-FL. The preys fused to RL are indicated below the graphs. Legend as in Figure 2A. **(B and C)** LUMIER IP showing *in vivo* interaction between TSC subunits in the presence (WT) or absence of PIH1D1 (KO) with an additional treatment with RUVBL1/2 ATPase inhibitor CB6644 (CB) or DMSO (CTL). Right panel: schematic representation of the assay. Legend as in Figure 2A. Left panel: graph plotting the IP efficiency of TSC1 (B) or TSC2 (C) fused to 3XFLAG-FL. The preys fused to RL are indicated below the graphs. Legend as in Figure 2A.

Model of assembly of TSC complex by the HSP90/R2TP system

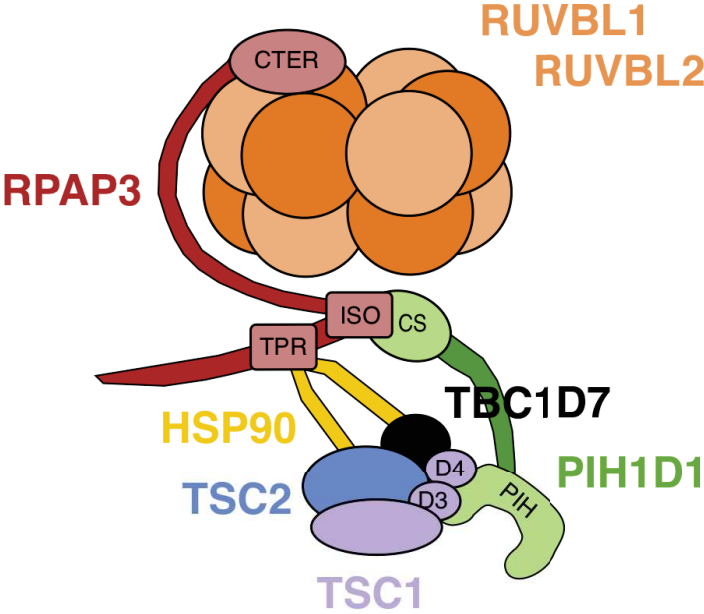


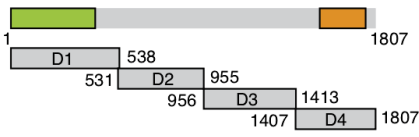
Figure 7

Figure 7. Model for HSP90/R2TP role in TSC complex assembly.

Model of assembly of TSC complex by the R2TP/HSP90 complex. TSC1 directly binds R2TP via PIH1D1 N_TER through its C-terminal part. TSC2 binds to HSP90 and several subunits of R2TP independently of TSC1. R2TP would work as a platform to promote association of TSC1 with TSC2. This association would be necessary for TSC2 release from R2TP.

A

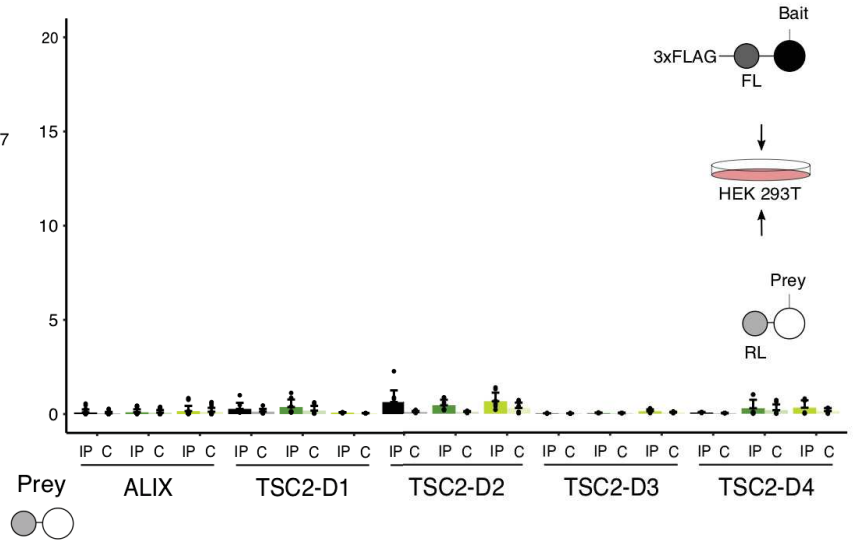
TSC2



TSC1 Binding Domain (1-418)
Putative Coiled Coil Region (346-371)
GAP Domain (1531-1758)

B

IP Efficiency % ■ PIH1D1 ■ PIH1D1_NTER ■ PIH1D1_NTER_K64A



C

Y2H interaction assays

pAS \ pACT	PIH1D1	PIH1D1_NTER	PIH1D1_NTER_K64A	RPAP3	TBC1D7 (0.5mM)	TSC1	TSC1-D1	TSC1-D2	TSC1-D3	TSC1-D4	TSC2	ALIX	RUVBL1	RUVBL2
PIH1D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIH1D1_NTER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIH1D1_NTER_K64A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPAP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBC1D7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSC1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TSC1-D1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TSC1-D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
TSC1-D3	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
TSC1-D4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TSC2	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
ALIX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RUVBL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RUVBL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

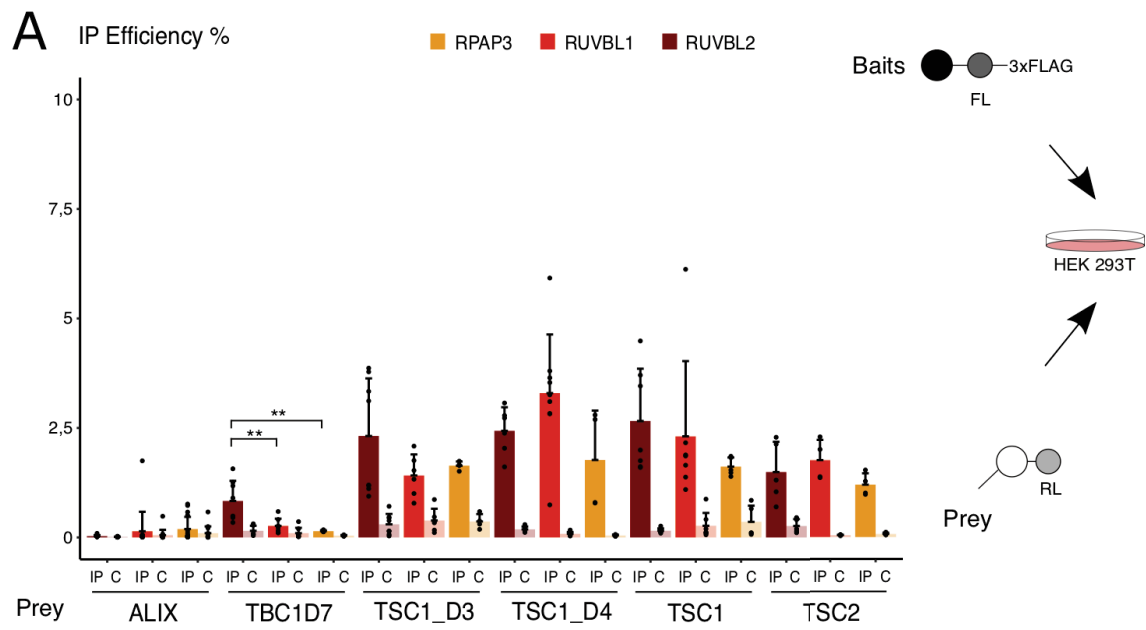
pAS \ pACT	PIH1D1 (10mM)	NTER (1mM)	NTER_K64A (1mM)
PIH1D1	+	-	-
PIH1D1_NTER	-	-	-
PIH1D1_NTER_K64A	-	-	-
RPAP3	-	-	-
TBC1D7	-	-	-
TSC1	+	-	-
TSC1-D1	-	-	-
TSC1-D2	-	-	-
TSC1-D3	+	+++	+
TSC1-D4	-	-	-
TSC2	-	-	-
ALIX	-	-	-

pAS \ pACT	RPAP3 (10mM)	RUVBL1	RUVBL2
PIH1D1	-	-	-
PIH1D1_NTER	-	-	-
PIH1D1_NTER_K64A	-	-	-
RPAP3	+	-	-
TBC1D7	-	-	-
TSC1	-	++	-
TSC2	-	-	-
ALIX	-	-	-
RUVBL1	+	-	+++
RUVBL2	+	-	-

Supplemental Figure 1

Sup Figure 1. Interaction tests for R2TP factors and TSC2 truncated mutants by LUMIER IP or with TSC1 and TSC2 by yeast two hybrid assays

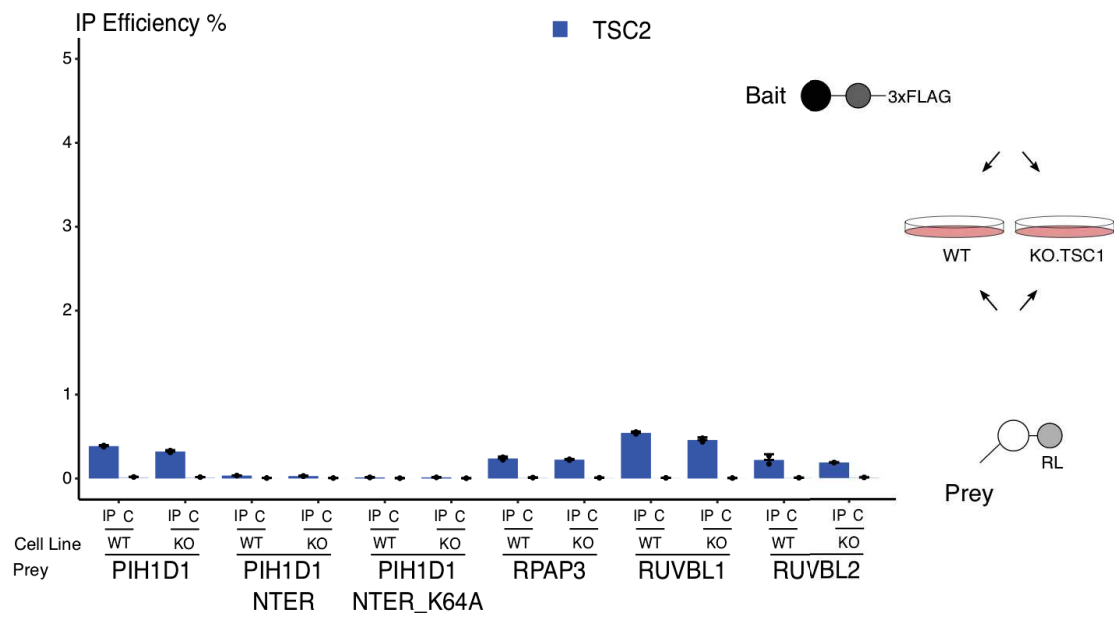
(A) Schematic architecture of human TSC2. Known domains of TSC2 described from the literature are represented with different colors and named below the drawing. Truncated mutants D1-D4 were generated with D1 and D4 containing these domains. Numbering corresponds to amino-acids. (B) LUMIER IP showing *in vivo* interaction between PIH1D1, PIH1D1_NTER, PIH1D1_NTER_K64A fused to 3XFLAG-FL and TSC2 truncated mutants fused to RL. Graph plot the IP efficiency (%) obtained by LUMIER IP. It measures the co-precipitation of the RL fusion proteins (RL IP/Input), normalized by the amount of FL fusion immunoprecipitated (FL IP/Input) obtained in a 96-well plate with anti-FLAG antibody and the extract from cells transfected with baits indicated at the top and preys below the graph. C is the IP efficiency with the same extract but in a control well without antibody. Bars represent means of almost 5 experiments. Error bars: standard deviation. (C) Yeast two-hybrid analysis of interactions between subunits of R2TP and TSC complex proteins. ALIX is a negative control. +++: strong interaction; ++: medium; +: weak; -: no interaction. Grey blocks represent untested interactions.



Supplemental Figure 2

Sup Figure 2. TSC2 and TSC1 FL, D3 and D4 bind to RPAP3, RUVBL1 and RUVBL2

LUMIER IP showing the *in vivo* interaction of RPAP3, RUVBL1 or RUVBL2 fused to 3XFLAG-FL with TSC1, TSC2 or TBC1D7 fused to RL. Graph plots the IP efficiency of the indicated proteins. C is for control without antibody. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly different with ** = p-value < 0.01 (Student T-test).

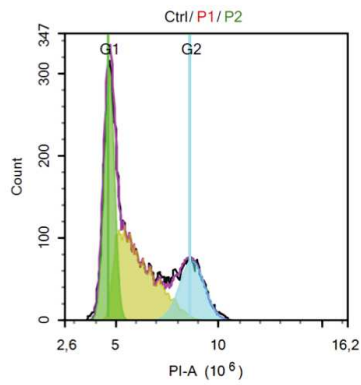


Supplemental Figure 3

Sup Figure 3. Weak binding of TSC2-3XFLAG-FL to R2TP factors

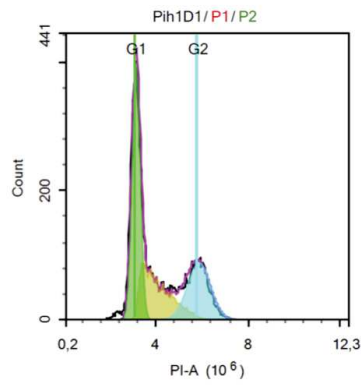
LUMIER IP showing the *in vivo* interaction of TSC2 fused to 3XFLAG-FL with RPAP3, RUVBL1 or RUVBL2 fused to RL in TSC1 KO cells or parental cells. Graph plots the IP efficiency of the indicated proteins. C is for control without antibody. Error bars: standard deviation.

A HEK 293T Cells



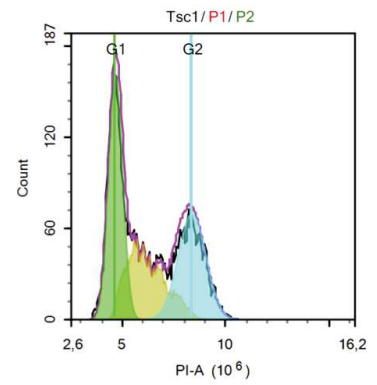
Freq G1: 42,33
Freq S: 35,92
Freq G2: 20,15

B KO.PIH1D1 Cells



Freq G1: 43,59
Freq S: 28,14
Freq G2: 27,20

C KO.TSC1 Cells



Freq G1: 38,24
Freq S: 29,46
Freq G2: 32,31

Supplemental Figure 4

Sup Figure 4.

(A, B and C) Cytometry measurement of DNA content of control HEK293T **(A)**, PIH1D1 KO **(B)** or TSC1 KO **(C)** cell lines used in this study. Propidium iodide was used to label the DNA before FACS cytometry. % of cells in G1, S and G2 determined is indicated below each graph showing no significant difference between the two clones.

Cell cycle of Parental HEK293T **(A)**, PIH1D1 KO **(B)** or TSC1 KO **(C)** cell lines

References

- Abel, Y., Paiva, A.C.F., Bizarro, J., Chagot, M.-E., Santo, P.E., Robert, M.-C., Quinternet, M., Vandermoere, F., Sousa, P.M.F., Fort, P., et al. (2021). NOPCHAP1 is a PAQosome cofactor that helps loading NOP58 on RUVBL1/2 during box C/D snoRNP biogenesis. *Nucleic Acids Res* *49*, 1094–1113.
- Assimon, V.A., Tang, Y., Vargas, J.D., Lee, G.J., Wu, Z.Y., Lou, K., Yao, B., Menon, M.-K., Pios, A., Perez, K.C., et al. (2019). CB-6644 Is a Selective Inhibitor of the RUVBL1/2 Complex with Anticancer Activity. *ACS Chem Biol* *14*, 236–244.
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* *307*, 1621–1625.
- Bizarro, J., Charron, C., Boulon, S., Westman, B., Pradet-Balade, B., Vandermoere, F., Chagot, M.-E., Hallais, M., Ahmad, Y., Leonhardt, H., et al. (2014). Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J Cell Biol* *207*, 463–480.
- Bizarro, J., Dodré, M., Huttin, A., Charpentier, B., Schlotter, F., Branlant, C., Verheggen, C., Massenet, S., and Bertrand, E. (2015). NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res* *43*, 8973–8989.
- Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jády, B.E., Rothé, B., Pescia, C., Robert, M.-C., Kiss, T., et al. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol* *180*, 579–595.
- Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M.-C., Ahmad, Y., Neel, H., et al. (2010). HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell* *39*, 912–924.
- Cloutier, P., Poitras, C., Durand, M., Hekmat, O., Fiola-Masson, É., Bouchard, A., Faubert, D., Chabot, B., and Coulombe, B. (2017). R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat Commun* *8*, 15615.
- Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., and Manning, B.D. (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell* *47*, 535–546.
- Domanski, M., Molloy, K., Jiang, H., Chait, B.T., Rout, M.P., Jensen, T.H., and LaCava, J. (2012). Improved methodology for the affinity isolation of human protein complexes expressed at near endogenous levels. *Biotechniques* *0*, 1–6.
- Gai, Z., Chu, W., Deng, W., Li, W., Li, H., He, A., Nellist, M., and Wu, G. (2016). Structure of the TBC1D7-TSC1 complex reveals that TBC1D7 stabilizes dimerization of the TSC1 C-terminal coiled coil region. *J Mol Cell Biol* *8*, 411–425.
- Henri, J., Chagot, M.-E., Bourguet, M., Abel, Y., Terral, G., Maurizy, C., Aigueperse, C., Georgescauld, F., Vandermoere, F., Saint-Fort, R., et al. (2018). Deep Structural Analysis of RPAP3 and PIH1D1, Two Components of the HSP90 Co-chaperone R2TP Complex. *Structure* *26*, 1196-1209.e8.
- Hodges, A.K., Li, S., Maynard, J., Parry, L., Braverman, R., Cheadle, J.P., DeClue, J.E., and Sampson, J.R. (2001). Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin. *Hum Mol Genet* *10*, 2899–2905.

Hoogeveen-Westerveld, M., Exalto, C., Maat-Kievit, A., van den Ouweland, A., Halley, D., and Nellist, M. (2010). Analysis of TSC1 truncations defines regions involved in TSC1 stability, aggregation and interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802, 774–781.

Hořejší, Z., Takai, H., Adelman, C.A., Collis, S.J., Flynn, H., Maslen, S., Skehel, J.M., Lange, T. de, and Boulton, S.J. (2010). CK2 Phospho-Dependent Binding of R2TP Complex to TEL2 Is Essential for mTOR and SMG1 Stability. *Molecular Cell* 39, 839–850.

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

Houry, W.A., Bertrand, E., and Coulombe, B. (2018). The PAQosome, an R2TP-Based Chaperone for Quaternary Structure Formation. *Trends in Biochemical Sciences* 43, 4–9.

Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412, 179–190.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648–657.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293.

Li, Y., Inoki, K., Vacratsis, P., and Guan, K.-L. (2003). The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* 278, 13663–13671.

Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N., and Meier, U.T. (2012). Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA* 18, 1833–1845.

Malinová, A., Cvačková, Z., Matějů, D., Hořejší, Z., Abéza, C., Vandermoere, F., Bertrand, E., Staněk, D., and Verheggen, C. (2017). Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *Journal of Cell Biology* 216, 1579–1596.

Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10, 151–162.

Martino, F., Pal, M., Muñoz-Hernández, H., Rodríguez, C.F., Núñez-Ramírez, R., Gil-Carton, D., Degliesposti, G., Skehel, J.M., Roe, S.M., Prodromou, C., et al. (2018). RPAP3 provides a flexible scaffold for coupling HSP90 to the human R2TP co-chaperone complex. *Nat Commun* 9, 1501.

Maurizy, C., Quinternet, M., Abel, Y., Verheggen, C., Santo, P.E., Bourguet, M., C F Paiva, A., Bragantini, B., Chagot, M.-E., Robert, M.-C., et al. (2018). The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones. *Nat Commun* 9, 2093.

Mayer, M.P., and Le Breton, L. (2015). Hsp90: Breaking the Symmetry. *Molecular Cell* 58, 8–20.

Mozaffari, M., Hoogeveen-Westerveld, M., Kwiatkowski, D., Sampson, J., Ekong, R., Povey, S., den Dunnen, J.T., van den Ouweland, A., Halley, D., and Nellist, M. (2009). Identification of a region required for TSC1 stability by functional analysis of TSC1 missense mutations found in individuals with tuberous sclerosis complex. *BMC Med Genet* 10, 88.

Muñoz-Hernández, H., Pal, M., Rodríguez, C.F., Fernandez-Leiro, R., Prodromou, C., Pearl, L.H., and

- Llorca, O. (2019). Structural mechanism for regulation of the AAA-ATPases RUVBL1-RUVBL2 in the R2TP co-chaperone revealed by cryo-EM. *Sci Adv* 5, eaaw1616.
- Nakashima, A., Yoshino, K., Miyamoto, T., Eguchi, S., Oshiro, N., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. (2007). Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 218–223.
- Paci, A., Liu, X.H., Huang, H., Lim, A., Houry, W.A., and Zhao, R. (2012). The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *J Biol Chem* 287, 43205–43214.
- Pal, M., Morgan, M., Phelps, S.E.L., Roe, S.M., Parry-Morris, S., Downs, J.A., Polier, S., Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2014). Structural Basis for Phosphorylation-Dependent Recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure* 22, 805–818.
- Potter, C.J., Pedraza, L.G., and Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4, 658–665.
- Prieto, M.B., Georg, R.C., Gonzales-Zubiate, F.A., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. (2015). Nop17 is a key R2TP factor for the assembly and maturation of box C/D snoRNP complex. *BMC Mol Biol* 16, 7.
- Santiago Lima, A.J., Hoogeveen-Westerveld, M., Nakashima, A., Maat-Kievit, A., van den Ouweland, A., Halley, D., Kikkawa, U., and Nellist, M. (2014). Identification of regions critical for the integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex. *PLoS One* 9, e93940.
- Sato, N., Koinuma, J., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S., Nakamura, Y., and Daigo, Y. (2010). Activation of an oncogenic TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 353–367.
- Tantale, K., Mueller, F., Kozulic-Pirher, A., Lesne, A., Victor, J.-M., Robert, M.-C., Capozzi, S., Chouaib, R., Bäcker, V., Mateos-Langerak, J., et al. (2016). A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat Commun* 7, 12248.
- Verheggen, C., Pradet-Balade, B., and Bertrand, E. (2015). SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway. *Oncotarget* 6, 41399–41400.
- von Morgen, P., Hořejší, Z., and Macurek, L. (2015). Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Front Genet* 6, 69.
- von Morgen, P., Burdova, K., Flower, T.G., O'Reilly, N.J., Boulton, S.J., Smerdon, S.J., Macurek, L., and Hořejší, Z. (2017). MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex. *Oncogene* 36, 4943–4950.
- Woodford, M.R., Sager, R.A., Marris, E., Dunn, D.M., Blanden, A.R., Murphy, R.L., Rensing, N., Shapiro, O., Panaretou, B., Prodromou, C., et al. (2017). Tumor suppressor Tsc1 is a new Hsp90 co-chaperone that facilitates folding of kinase and non-kinase clients. *EMBO J* 36, 3650–3665.
- Zhao, R., Kakiyama, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., et al. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol* 180, 563–578.

ARTICLE 2 : Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones

Anna Malinová,^{1,4} Zuzana Cvačková,¹ Daniel Matějů,¹ Zuzana Hořejší,¹ Claire Abéza,² Franck Vandermoere,³ Edouard Bertrand,² David Staněk,¹ and Céline Verheggen²

¹ Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic

² Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Montpellier, 34293 Montpellier, France

³ Institut de Génomique Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France

⁴ Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic

Résumé

L'épissage est réalisé par le spliceosome, un complexe de cinq particules ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) : U1, U2, U4/U6, et U5. Les snRNA (« *small nuclear RiboNucleicAcid* ») sont transcrits dans le noyau pour ensuite être transportés dans le cytoplasme pour s'assembler avec les protéines Sm communes à tous les snRNA. Chaque snRNA subit une étape d'hyperméthylation de la coiffe en 5' avant d'être réimporté. Dans toutes ces étapes de maturation, les RNP ont besoin de machineries d'assemblage spécifique telles que le complexe SMN, (« *survival of motor neurons* »), qui va charger les protéines Sm sur les snRNA dans le cytoplasme, Tgs1 pour l'hyperméthylation de la coiffe, la snurportine pour le ré-import de la particule. Dans le noyau, les pré-snRNP transitent dans les corps de Cajal (CB) où l'ARN subit des modifications par les scaRNA (« *specific Cajal Bodies RNA* »).

Des protéines spécifiques à chaque snRNP s'assemblent également à ces particules mais il n'est pas bien défini si cela se fait avant ou après l'import des pré-snRNP. Les protéines spécifiques de la snRNP U5 sont très conservées de la levure jusqu'à l'homme. En particulier, les protéines spécifiques PRPF8/EFTUD2/SNRNP200 de U5 jouent un rôle fondamental dans l'épissage. PRPF8, aussi nommée PRP8 chez la levure, est la plus grosse protéine du spliceosome et elle forme le cœur catalytique de ce dernier. EFTUD2 et SNRNP200 sont impliquées dans la dissociation du complexe snRNP U4/U6 durant l'épissage. Le laboratoire voulait étudier comment les protéines spécifiques de la snRNP U5 (PRPF8, EFTUD2, AAR2) s'associent à la pré-snRNP avant de former un complexe U5 mature nucléaire contenant U5 et les protéines Sm où AAR2 est remplacé par SNRNP200. Un pré-complexe protéique formé dans le cytoplasme et constitué de Prp8p, Snu114p (homologue de EFTUD2) et Aar2p a été décrit chez la levure (Boon, 2007) et nous avons trouvé leurs homologues humains dans nos études protéomiques des partenaires du R2TP laissant penser que le système HSP90/R2TP pouvait jouer un rôle dans la formation d'un pré-complexe protéique

chez l'homme.

La rétinite pigmentaire (Retinitis Pigmentosa) est une maladie dégénérative progressive qui peut être causée par des mutations dans les gènes codant pour des protéines spécifiques des snRNP. Dans cette étude, huit mutations ponctuelles dans la protéine PRPF8 ont été étudiées car des mutations dans les protéines spécifiques des snRNP sont très communément impliquées dans cette maladie. De plus, des mutations similaires dans Prp8p de levure provoquent des défauts de croissance et d'épissage. Aucune des protéines mutantes chez l'homme ne semble restaurer l'épissage en absence de PRPF8 sauvage (Figures 2 et S1). La majorité de ses mutations bloque la formation de la tri-snRNP composé de U5 mature associé à la di-snRNP U4/U6 mature (Figure 3) mais d'autres modifient l'activation du partenaire SNRNP200 et perturbent donc l'activation du spliceosome. Ces mutations sur PRPF8 ne perturbent pas sa localisation nucléaire, ni son association avec EFTUF2 mais bloque l'échange de AAR2 par SNRNP200. Plus de PRPF8 peut être observé dans le cytoplasme pour certains mutants. Dans des cellules où PRPF8 est déplété, le pré-complexe U5 reste bloqué dans les CB sans finir sa maturation (*Novotný, 2015*). Ce pourrait donc être dans les CB que AAR2 est libéré de la particule U5. Très récemment, il a été montré que AAR2 chez l'homme reste associé après que SNRNP200 ait rejoint la particule, contrairement à ce qui se passe chez la levure où Brp2p (l'homologie de SNRNP200) vient en remplacement de Aar2p (*Klimesova, K., en révision à Mol Cell*)

Dans cet article, il a été montré que le complexe HSP90/R2TP interagit de manière indépendante avec PRPF8 et EFTUD2 dans le cytoplasme afin de former le pré-complexe protéique avec AAR2 et un cofacteur du R2TP, ZNHIT2. La déplétion des protéines du snRNP U5, comme les mutations de PRPF8, augmentent l'association de PRPF8 et EFTUD2 avec le R2TP dans le cytoplasme. Toutes nos données suggèrent que les intermédiaires d'assemblages incomplets du pré-complexe protéique restent associés au R2TP dans le cytoplasme et que seuls les pré-complexes correctement assemblés pourraient être transportés dans le noyau. Le système HSP90/R2TP jouerait ainsi un rôle de contrôle de qualité pour s'assurer que seules les protéines correctement repliées ou les complexes correctement assemblés pourraient être importés dans le noyau. Un modèle similaire a déjà été proposé par le laboratoire pour l'ARN Polymérase II. Des pré-complexes d'assemblage associés au système HSP90/R2TP sont maintenus dans le cytoplasme et seules les complexes entièrement assemblés sont importés dans le noyau (*Boulon, 2010*).

PIH1D1 reconnaît les séquences DSDD/E phosphorylées des clients du R2TP au niveau de son domaine NTER. EFTUD2 possède un domaine DSDED phosphorylé et interagit de manière phospho-dépendante avec PIH1D1 *in vitro* (*Hořejší, 2014*). Nous avons généré un mutant de ce motif mimant une absence de phosphorylation (DADED) et réalisé une IP. La mutation de cette sérine phosphorylée affecte la composition de la snRNP U5 ainsi que sa localisation. En effet, les

données de protéomique montrent un défaut majeur d'assemblage des protéines de la snRNP U5 et l'analyse de la localisation des protéines montre une accumulation des différentes sous-unités dans le cytoplasme. Ces données montrent donc le rôle essentiel du motif DSDED de EFTUD2 pour la biogenèse de U5.

C'est dans cet article que nous avons publié l'étude par protéomique des interactants du domaine NTER de PIH1D1. Elle montrait pour la première fois une forte interaction avec les membres du complexe TSC qui a fait l'objet de ma thèse (Figure 6A). Dans le même temps, Cloutier *et al.* ont publié cette interaction en co-immunoprécipitant TSC1 et TSC2 avec RPAP3 et URI1 (Cloutier, 2017). Une IP contre TSC1 ou TSC2 permet également de co-purifier RUVBL1 et RUVBL2 et d'autres composants du R2TP/PFDL.

Contribution personnelle

Vérification des interactions entre R2TP et les composants de U5.

J'ai validé les interactions entre le R2TP et les protéines du pré-complexe U5 par des co-immunoprécipitations et Western Blot. Pour cela, j'ai réalisé des immuno-précipitations (IP) de RPAP3 et PIH1D1 et révélé que je co-précipitais bien PRPF8 et EFTUD2. ZNHIT2 est un facteur associé au R2TP. Son interaction avec les protéines du pré-U5 a été testée par co-IP en utilisant une fusion GFP-ZNHIT2. J'ai pu vérifier l'interaction entre ZNHIT2 et PRP8 en western blot mais EFTUD2 et SNRNP200 sont également présents dans les données de protéomiques (Figure 4D).

Test des siARN et localisation intracellulaire du R2TP et du pré-U5

Pour caractériser le rôle du R2TP et de ZNHIT2 dans la formation du pré-U5, j'ai réalisé des co-IP dans des conditions où les facteurs du pré-U5 ont été déplétés avec des siARN. J'ai vérifié l'efficacité des siARN utilisés sur des cellules HeLa en analysant par Western Blot le niveau d'expression de la protéine correspondante après transfection avec les différents siARN. J'ai mis en évidence par Western Blot sur une IP anti-RPAP3 que le siARN dirigé contre EFTUD2 n'a pas d'impact sur l'interaction entre RPAP3 et PRPF8. En revanche, lorsque j'utilise un siARN dirigé contre PRPF8, j'observe une augmentation de l'interaction entre RPAP3 et EFTUD2.

J'ai ensuite réalisé un test de co-recrutement afin de voir la localisation sub-cellulaire de ces interactions. Mon équipe possédait déjà des cellules qui expriment stablement RPAP3 en fusion avec la protéine fluorescente DsRed ainsi qu'avec la protéine p54, spécifique des P-bodies. Dans ces cellules, RPAP3 se concentre dans des structures cytoplasmiques qui fluorescent en rouge. Pour évaluer l'impact de EFTUD2 sur cette l'interaction entre RPAP3 et PRP8, j'ai utilisé un siARN contrôle (siNC) ou un siARN dirigé contre EFTUD2 pour traiter les cellules avant

l'immunofluorescence. Les résultats sont présentés en Figure 5A avec PRPF8 détecté avec un anticorps anti-PRPF8 puis un anticorps secondaire couplé au FITC (panneau de gauche) et RPAP3 détecté avec la protéine DsRed (panneau du milieu). On visualise bien l'interaction RPAP3/PRPF8 en présence ou en absence de EFTUD2 (panneau de droite). J'ai également testé par la même technique l'interaction entre EFTUD2 et RPAP3. EFTUD2 est faiblement associé à RPAP3 en condition normale (Figure 5C condition siNC). Mais lorsque je déplète PRPF8 par siARN, j'observe une augmentation de l'interaction RPAP3/EFTUD2 (Figure 5C condition siPRPF8). Ceci indique que EFTUD2 interagit avec le R2TP dans le cytoplasme de manière PRPF8-indépendante.

HSP90 est nécessaire pour la stabilité de PRPF8 dans le cytoplasme

J'ai ensuite voulu évaluer la participation de HSP90 dans la stabilité des protéines du pré-U5 dans le cytoplasme. Toujours en utilisant la technique de co-recrutement, j'observe que le signal DsRed de RPAP3 co-localise avec le signal FITC de PRPF8 au niveau des points cytoplasmiques (Figure 8B condition -GA). Lorsque je traite à la geldanamycine, un inhibiteur de HSP90, cette co-localisation est abolie (+GA). Ces données suggèrent donc que l'activité de HSP90 est nécessaire pour stabiliser PRPF8 présent dans le cytoplasme.

Effet des siARN dirigés contre le R2TP sur le niveau de EFTUD2

Nous avons ensuite voulu évaluer l'effet de la déplétion des sous-unités du R2TP sur la stabilité de la protéine EFTUD2. Des siARN contre les sous-unités du R2TP ont donc été transfectés dans des cellules HeLa avec un plasmide codant une luciférase Renilla (RL) et un plasmide codant une luciférase Firefly (FFL) vide ou fusionné à EFTUD2. 48 h après la transfection, j'ai mesuré l'activité des deux luciférases. L'activité de la Renilla Luciférase me permet de normaliser les valeurs et de m'affranchir des variations dues au taux de transfection. La mesure de l'activité de la Firefly seule permet d'identifier un effet spécifique des siARN sur l'expression de EFTUD2. On remarque que l'expression de FFL-EFTUD2 est affectée par la déplétion de PIH1D1, RUVBL2 mais aussi de ZNHIT2, un co-facteur du R2TP (Figure 7A). EFTUD2 est donc déstabilisée en absence de ces facteurs. Cet effet n'est pas observé avec un siARN dirigé contre RPAP3 qui au contraire semble stabiliser EFTUD2.

Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones

Anna Malinová,^{1,4} Zuzana Cvačková,¹ Daniel Matějů,¹ Zuzana Hořejší,¹ Claire Abéza,² Franck Vandermoere,³ Edouard Bertrand,² David Staněk,¹ and Céline Verheggen²

¹Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic

²Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Montpellier, 34293 Montpellier, France

³Institut de Génomique Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France

⁴Faculty of Science, Charles University in Prague, 128 00 Prague, Czech Republic

Splicing is catalyzed by the spliceosome, a complex of five major small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs). The pre-mRNA splicing factor PRPF8 is a crucial component of the U5 snRNP, and together with EFTUD2 and SNRNP200, it forms a central module of the spliceosome. Using quantitative proteomics, we identified assembly intermediates containing PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 in association with the HSP90/R2TP complex, its ZNHIT2 cofactor, and additional proteins. HSP90 and R2TP bind unassembled U5 proteins in the cytoplasm, stabilize them, and promote the formation of the U5 snRNP. We further found that PRPF8 mutants causing Retinitis pigmentosa assemble less efficiently with the U5 snRNP and bind more strongly to R2TP, with one mutant retained in the cytoplasm in an R2TP-dependent manner. We propose that the HSP90/R2TP chaperone system promotes the assembly of a key module of U5 snRNP while assuring the quality control of PRPF8. The proteomics data further reveal new interactions between R2TP and the tuberous sclerosis complex (TSC), pointing to a potential link between growth signals and the assembly of key cellular machines.

Introduction

Pre-mRNA splicing is a crucial step in eukaryotic gene expression that greatly diversifies the proteome. Splicing is catalyzed by a complex called the spliceosome, which consists of five major small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) and numerous non-snRNP proteins. Each snRNP contains a short noncoding uridine-rich RNA (snRNA), a ring of seven Sm or Like-Sm (in the case of U6 RNP) proteins, and 1–12 proteins that are specific for each snRNP (Matera and Wang, 2014).

The assembly of Sm-type snRNPs is a complex process that involves both cytoplasmic and nuclear phases. In metazoans, the nascent snRNAs are rapidly exported to the cytoplasm, where they associate with the survival of motor neurons (SMN) complex. This promotes the assembly of the Sm ring

around a specific snRNA sequence (Matera and Wang, 2014; Raimer et al., 2016), and this core snRNP is then reimported to the nucleus, where it first appears in nuclear structures called Cajal bodies (CBs; Sleeman and Lamond, 1999). Here, the final stages of snRNP biogenesis occur, namely snRNA modifications and formation of mature snRNPs, which include the addition of snRNP-specific proteins and assembly of complex snRNPs (Staněk, 2016). Although the assembly of the Sm core by the SMN complex has been studied in great detail, little is known about the biogenesis of snRNP-specific proteins despite their importance for splicing.

Recent structural studies show that the U5 snRNP plays a central role in the spliceosome and particularly the highly conserved U5 protein PRPF8 (Yan et al., 2015; Bertram et al., 2017). PRPF8 adopts a complex 3D structure with a central cavity that forms the catalytic center of the spliceosome. PRPF8 also holds two other U5-specific proteins that perform essential functions during splicing: the helicase SNRNP200 (Brr2 in yeast) and the GTPase EFTUD2 (Snu114 in yeast). SNRNP200 unwinds the U4/U6 duplex to activate the spliceosome, whereas EFTUD2, along with PRPF8, controls SNRNP200 activity (Kuhn et al., 1999; Small et al., 2006; Maeder et al., 2009;

Correspondence to David Staněk: stanek@img.cas.cz; Edouard Bertrand: edouard.bertrand@igmm.cnrs.fr; Céline Verheggen: celine.verheggen@igmm.cnrs.fr

D. Matějů's present address is Max Planck Institute for Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden 01307, Germany.

Z. Hořejší's present address is Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London EC1M 6BQ, England, UK.

Abbreviations used: BAC, bacterial artificial chromosome; CB, Cajal body; FFL, firefly luciferase; GA, geldanamycin; HIT, histidine triad motif; IF, immunofluorescence; IP, immunoprecipitation; KD, knock down; LAP, localization and affinity purification; MPN, Mpr1/Pad1 N-terminal; NC, negative control; RL, Renilla luciferase; RP, Retinitis pigmentosa; SILAC, stable isotope labeling in cell culture; SMN, survival of motor neurons; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein particles; snRNA, short noncoding uridine-rich RNA; snRNP, small nuclear ribonucleoprotein particle; TSC, tuberous sclerosis complex; WB, Western blotting; WT, wild type.

© 2017 Malinová et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date [see <http://www.rupress.org/terms/>]. After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>].



Mozaffari-Jovin et al., 2012, 2013, 2014; Nguyen et al., 2013). Studies of the biogenesis of Prp8 in *Saccharomyces cerevisiae* showed that yeast Prp8 has a dedicated chaperone called Aar2, which forms a cytoplasmic complex with Prp8 and Snu114 (Gottschalk et al., 2001; Boon et al., 2007). This complex then binds U5 snRNA and translocates to the nucleus, where Aar2 is released and replaced by the helicase Brr2 (Boon et al., 2007). The biogenesis of snRNPs differs significantly between *S. cerevisiae* and metazoans (e.g., *S. cerevisiae* does not have the SMN protein), and despite the crucial roles of PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 in splicing, the biogenesis of these proteins is still uncharacterized in mammals.

It is noteworthy that investigation of Prp8 maturation in yeast used mutations that cause a hereditary retina dystrophy in humans (Boon et al., 2007). This disease, called Retinitis pigmentosa (RP), affects 1 out of 4,000 people worldwide and causes the gradual damage of rods and cones in the retina (Hartong et al., 2006; Mordes et al., 2006). There are nearly 90 genes that are associated with RP (RetNet Database), and many of them are known to be involved in retinal function, structure, and metabolism. However, the second most common target of RP mutations codes for ubiquitously expressed pre-mRNA splicing factors, including PRPF8 (Růžicková and Staněk, 2016). In PRPF8, all RP mutations cluster within the C-terminal Jab1/MPN (Mpr1/Pad1 N-terminal) domain that binds SNRNP200 (McKie et al., 2001; Kondo et al., 2003; Martínez-Gimeno et al., 2003; Ziviello et al., 2005; Towns et al., 2010). RP mutations in Prp8 have been originally studied in yeast, where different mutants exhibited growth and splicing defects (Boon et al., 2007; Maeder et al., 2009; Mozaffari-Jovin et al., 2013). Yeast and in vitro studies further demonstrated that mutations in the Jab1/MPN domain negatively affect the interaction with Brr2 and Snu114 proteins and alter the regulation of Brr2 helicase activity (Boon et al., 2007; Pena et al., 2007; Maeder et al., 2009; Mozaffari-Jovin et al., 2013, 2014).

In this study, we used RP mutations to study the biogenesis of the human PRPF8 protein, and we analyzed factors involved in the maturation of U5-specific proteins. We identified assembly intermediates containing PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 together with the chaperones HSP90/R2TP and AAR2. Furthermore, we provide evidence that the HSP90/R2TP machinery is involved in the assembly of this key module of U5 snRNP and that it helps discriminate between wild-type (WT) and assembly-defective mutants of PRPF8.

Results

RP mutations affect PRPF8 stability and localization

To study how RP-linked mutations influence the function of the PRPF8 protein, we introduced mutations into a bacterial artificial chromosome (BAC) that contained the entire human PRPF8 gene tagged at the protein C terminus with a localization and affinity purification (LAP) tag. This preserves the gene regulatory sequences and allows for protein expression at endogenous levels (Poser et al., 2008). We chose a C-terminal tag because an N-terminal FLAG-tag was previously shown to hinder the nuclear localization of Prp8 in *Drosophila melanogaster* (Claudius et al., 2014). In addition, PRPF8-WT-LAP fully complemented the depletion of endogenous PRPF8 (see next section), showing that the tag at the C terminus did not con-

flict with the function of the protein. There are 19 known mutations in the PRPF8 gene that cause RP (Růžicková and Staněk, 2016). We selected mutations that result in single amino acid changes, including the most common substitutions, H2309P, H2309R, and R2310K. We further chose S2118F, which is the first mutation found outside exon 42, and mutations P2301T, R2310G, F2314L, and Y2334N, which are found at different positions within the Jab1/MPN domain (Fig. 1, A and B). Using a two-step scarless mutagenesis method (Poser et al., 2008; Cvačková et al., 2014), individual mutations were introduced into the PRPF8-LAP BAC, and all LAP-tagged proteins were stably expressed in HeLa cells (Fig. 1 C).

Neither WT nor RP mutants altered cell proliferation (not depicted), and WT and all mutated proteins localized to the cell nucleus. However, most mutated proteins were also partially present in the cytoplasm, with the S2118F mutant exhibiting the strongest cytoplasmic accumulation (Fig. 1, C and D). In addition, the expression of all RP mutants, with the exception of F2314L, was lower than PRPF8-WT-LAP (Fig. S1 A). The decrease in protein level may be caused by reduced expression or faster degradation. Because the promoter and cis-regulatory elements are identical for all PRPF8 variants, we examined the protein degradation rate. We blocked protein synthesis using cycloheximide and measured GFP fluorescence intensity at 15-min intervals over an 8-h period (Fig. S1 B). We observed that the stability of mutant proteins correlated with their expression level. Of the mutants analyzed, F2314L exhibited a degradation rate similar to the WT protein, whereas the other mutants were degraded more rapidly. S2118F and H2309P/R mutants were found to be the least stable.

RP mutations reduce splicing efficiency

We then tested whether PRPF8 proteins with RP mutations were able to complement the depletion of endogenous PRPF8. To specifically knock down (KD) PRPF8, we used siRNA that was designed over the stop codon and that did not target the PRPF8-LAP fusion protein mRNA (Novotný et al., 2015). We frequently observed an increase in the expression of PRPF8-LAP proteins upon the KD of PRPF8 (Fig. S4 and not depicted), which likely reflects compensation for reduced levels of PRPF8. To assay the functionality of PRPF8-LAP fusion proteins in splicing, we analyzed the splicing efficiency of the endogenous LDHA gene or used an ectopically expressed reporter which was derived from the β -globin gene. Finally, we used three reporters that were derived from retina-specific genes: rhodopsin (RHO), fascin actin-bundling protein 2 (FSCN2), and retinal outer segment membrane protein 1 (ROM1). The KD of PRPF8 in parental HeLa cells significantly reduced splicing efficiency of all tested genes and was rescued by the expression of PRPF8-WT-LAP (Fig. 2, A–E; and Fig. S1, C–F). In contrast, none of the RP mutants was able to completely rescue splicing, but splicing defects varied among the tested genes and mutants. The strongest defects were observed for S2118F and H2309R mutations, which were not able to rescue splicing of four tested genes (except for LDHA). Out of all the tested RP mutations, the Y2334N mutant exhibited notably different behavior. It strongly reduced LDHA splicing, but other splicing reporters were unaffected. Interestingly, we observed diverse effects of PRPF8 KD on splicing efficiency of the tested genes. The β -globin reporter was less sensitive to the reduction of PRPF8 (Figs. 2 B and S1 C), whereas the splicing efficiency of two retina-specific reporters (FSCN2 and RHO) dropped below 50% after PRPF8 KD. Four

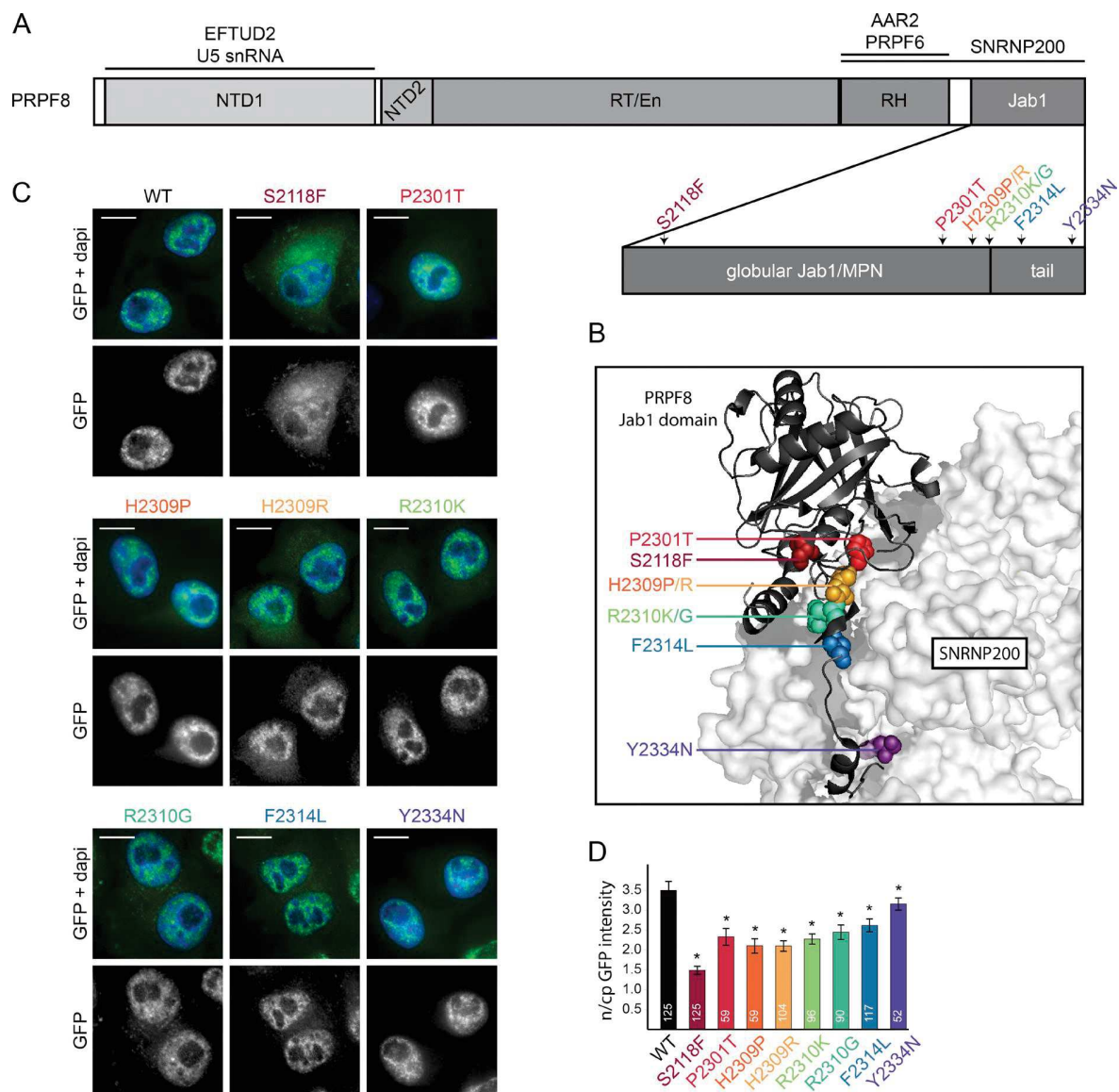


Figure 1. Description of PRPF8 and its RP-linked mutations. (A) A schematic organization of PRPF8 domains. RP-related mutations from this study are indicated by different colors. RH, RNase H-like domain. (B) View of the interaction between the C-terminal Jab1/MPN domain of PRPF8 (cartoon representation) and SNRNP200 (surface representation). The PRPF8 RP mutations are indicated with the same color code as in A. The picture is based on Mozaffari-Jovin et al. [2013]; Protein Data Bank accession no. 4KIT. (C) Intracellular localization of PRPF8 variants. Panels are microscopy images of HeLa cells stably expressing the indicated LAP-tagged PRPF8 variants. Green/bottom panels, GFP; Blue, DAPI. Bars, 10 μ m. (D) Nucleocytoplasmic (n/cp) localization of PRPF8 RP mutants. The ratio of nuclear and cytoplasmic GFP intensity was quantified using ImageJ. The mean of 52–125 cells (numbers of experiments are indicated in individual columns) together with the SD is shown. *, $P < 0.05$, as measured with t test comparing the indicated sample and the PRPF8-WT-LAP-expressing cells.

RP mutants (S2118F, H2309P, H2309R, and R2310K) were not able to rescue the splicing defects of all tested retina-specific reporters (Fig. 2, C–E; and Fig. S1, D–F). In general, splicing of retina-specific reporters was more sensitive to the reduction of PRPF8 levels, and RP mutants rescued retina-specific genes less efficiently than other genes. Collectively, these data show that the tested RP mutations affect the splicing activity of PRPF8.

RP mutations compromise U5 snRNP maturation and formation of the U4/U6.U5 tri-snRNP

To test whether the splicing defects observed with the PRPF8 mutants were caused by a reduced snRNP assembly, we mea-

sured the interaction of RP mutants with several snRNP-specific proteins. PRPF8 RP mutants and WT proteins were immunoprecipitated using anti-GFP antibodies, and the coprecipitated proteins were detected by Western blotting (WB; Fig. 3 A). PRPF8-WT-LAP was properly incorporated into U5 and tri-snRNPs, as documented by the coprecipitation of U5-specific proteins (SNRNP200, EFTUD2, and PRPF6) and of the U4/U6-specific factor PRPF31. To quantitatively evaluate the PRPF8 mutants, the amount of coprecipitated proteins was quantified and normalized to the GFP signal in the pellets (Fig. 3 B). With the exception of Y2334N, which did not display any visible alterations, the mutants exhibited defects in the binding of SNRNP200, which is consistent with the location of

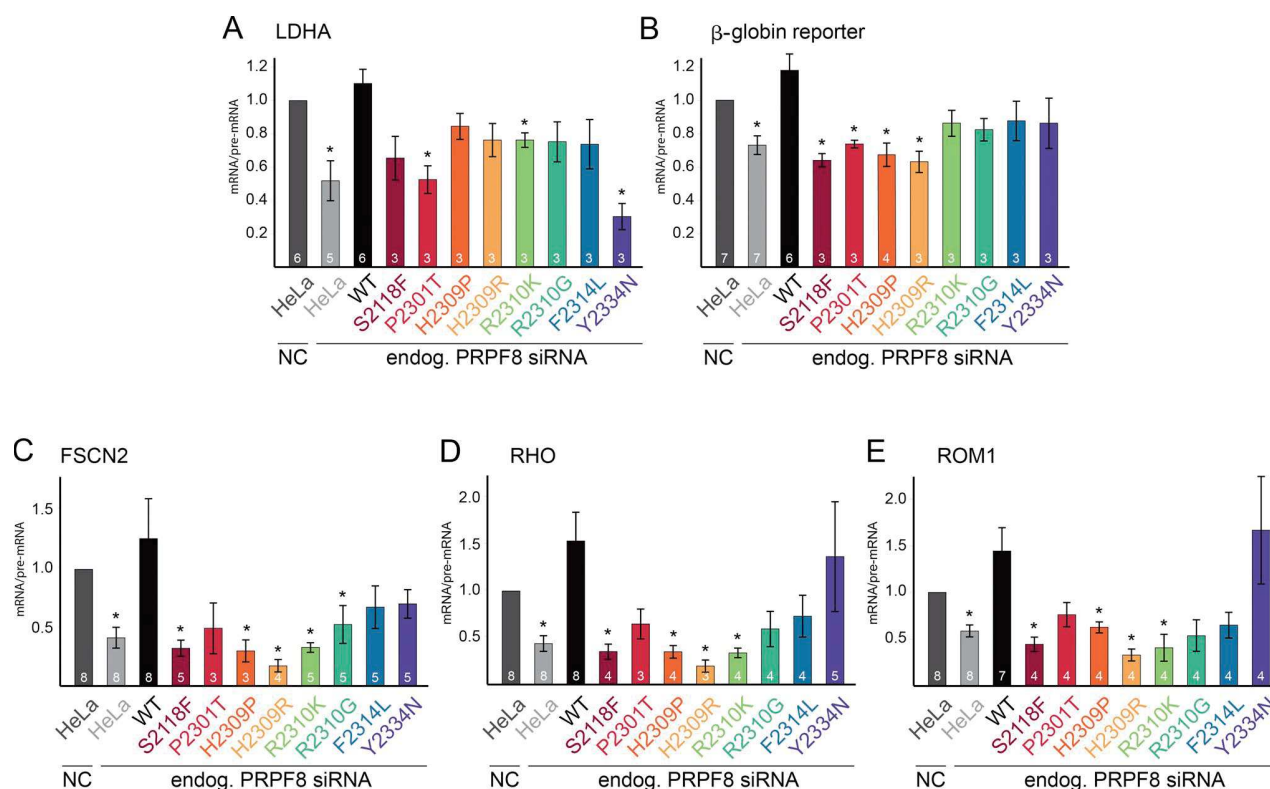


Figure 2. PRPF8 RP mutations affect splicing. (A) Splicing efficiencies of PRPF8 mutants. Graphs display the splicing efficiencies of the endogenous (endog.) LDHA expressed as the ratio of mRNA over pre-mRNA and measured by reverse transcription quantitative PCR in cells knocked down for PRPF8 and expressing the indicated LAP-tagged PRPF8 variants. Results have been normalized to the ratio obtained in parental HeLa cells treated with an NC siRNA. (B–E) Graphs displaying the splicing efficiency of β -globin gene reporter (B) and retina-specific gene reporters FSCN2 (C), RHO (D), and ROM1 (E). Legend is the same as in A except that RT-PCR was used instead of reverse transcription quantitative PCR. Error bars represent SEM. Numbers of experiments are indicated in individual columns. *, $P < 0.05$, as measured with t test comparing the indicated sample and the parental cells treated with the control siRNA.

the mutations in the SNRNP200 interaction domain Jab1/MPN. This translated into a reduced snRNP formation, demonstrated by significantly lower amounts of PRPF6 and PRPF31 copurified with the mutants as compared with WT (except for the F2314L mutant). These data show that most RP mutations in the PRPF8 gene reduce the formation of snRNPs.

In yeast, Prp8 and Snu114 form an intermediate complex with the chaperone Aar2 before joining U5 snRNA. To test whether this was also the case in human cells, we tested the association of PRPF8 RP mutants with AAR2 and EFTUD2. Both AAR2 and EFTUD2 efficiently copurified with all mutated proteins (Fig. 3, A–D), and two RP mutants even showed a significantly enhanced coprecipitation in comparison with WT. Increased interactions with EFTUD2 and AAR2 correlated with a decreased binding of the mutants to the other U5-specific proteins. These results support the idea that PRPF8, AAR2, and EFTUD2 form an assembly intermediate in human cells and that some of the mutants are trapped at this stage. To test whether this intermediate complex associates with the core U5 snRNP, we measured the interaction of selected PRPF8 RP mutants with Sm proteins, which stably associate with U5 snRNA. We compared two PRPF8 mutations, S2118F and H2309R, which stall its biogenesis, with WT and the F2314L mutant that are both incorporated into U5 and the tri-snRNPs (Fig. 3, A and B). We immunoprecipitated snRNPs via Sm proteins and analyzed coprecipitated PRPF8-LAP fusion proteins (Fig. 3 E). We found that the F2314L mutant copurified with Sm proteins to

the same extent as WT. In contrast, the S2118F and H2309R mutants showed only negligible interaction with Sm proteins. Collectively, these data provide strong support for the idea that PRPF8 associates with EFTUD2 and AAR2 early in its assembly pathway. Immunoprecipitation (IP) of Sm proteins further suggests that the PRPF8-AAR2-EFTUD2 is formed before its loading onto the core U5 snRNP and that at least two tested RP mutations (S2118F and H2309R) stall assembly at this stage.

AAR2, ZNHIT2, and the HSP90/R2TP complex associate with the U5-specific proteins EFTUD2, PRPF8, and SNRNP200

These data indicate that the assembly pathway of PRPF8 appears to be key to understanding the molecular defects that are caused by RP mutations. To define this pathway in more detail, we used an unbiased quantitative proteomic approach based on stable isotope labeling in cell culture (SILAC) in conjunction with anti-GFP IP (Ong et al., 2002; Trinkle-Mulcahy et al., 2008). We first used HeLa cell-expressing PRPF8-LAP (see the first Results section) and GFP-EFTUD2 as bait (Fig. 4, A and B). In the latter cells, GFP-EFTUD2 localized mainly to nuclear speckles, as expected, and was also weakly detected in the cytoplasm (Fig. S2 A). The proteomic analysis of the GFP IPs showed a strong association of PRPF8-LAP with its partners EFTUD2 and SNRNP200, and conversely, GFP-EFTUD2 strongly bound PRPF8 and SNRNP200. Several other compo-

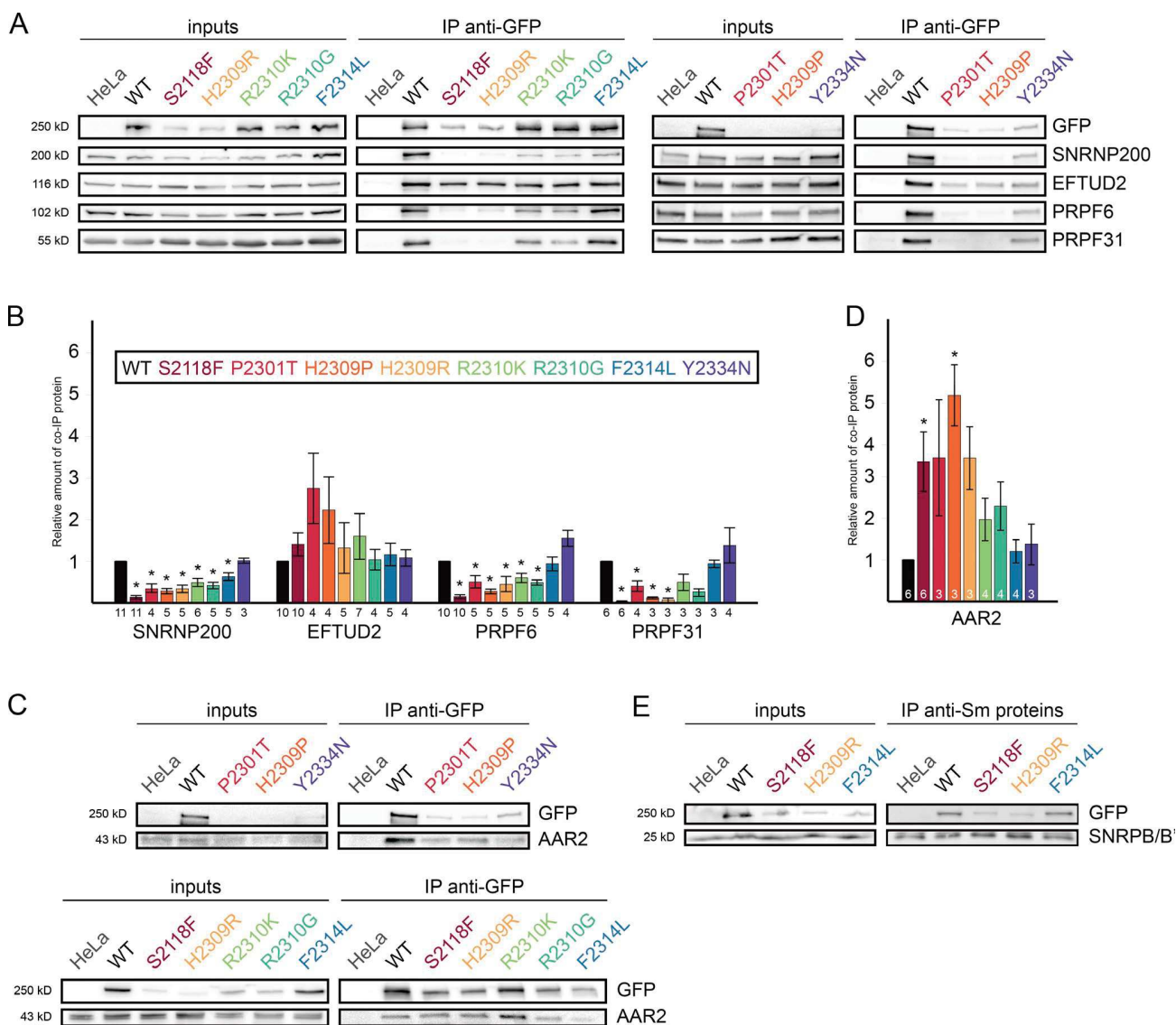


Figure 3. RP mutations inhibit U5 snRNP assembly. (A) Association of PRPF8 variants with U5 and U4/U6.U5 snRNPs. PRPF8-LAP variants are indicated at the top. IP was done with anti-GFP antibodies. Inputs contained 2% of the materials in the IP, and the antibodies used for WB are indicated at the right. (B) Quantification of the immunoprecipitated material. The graph displays the amount of the protein present in the pellet and normalized, first to the amount of copelleted GFP and then to the same ratio measured in the PRPF8-WT-LAP pellets. (C and D) Association of PRPF8 variants with AAR2. Legend is as in A and B. Error bars represent SEM. The exact number of each experiment is indicated below/in each column. * $P < 0.05$, as measured with t tests comparing the indicated sample and WT PRPF8-LAP IPs. (E) Association of three selected PRPF8 variants with snRNPs. WBs were made with extracts of cells expressing the PRPF8-LAP variant indicated at the top (input lanes) and immunoprecipitated with anti-Sm Y12 antibody. PRPF8-LAP proteins were detected with anti-GFP antibody and SNRNP/B' with the Y12 antibody. Inputs contain 2% of the materials in the IP.

nents of U5 snRNP were identified with high SILAC ratios in the two IPs, namely SNRNP40, PRPF6, and Sm proteins. Additional tri-snRNP components were also detected (e.g., SART1, USP39, and PRPF4), indicating that the tagged proteins were incorporated into U5 and tri-snRNPs. In agreement with our coimmunoprecipitations (Fig. 3, C and E), AAR2 was also detected with high SILAC ratios in both the PRPF8 and EFTUD2 IPs, indicating that in addition to the mature U5 snRNP, the IPs also detected assembly intermediates. Interestingly, additional chaperones were found, including HSP70 and HSP90, regulators of HSP90 (PTGES3 and STIP1), and subunits of R2TP (RUVBL1 and 2), a known HSP90 cochaperone. Finally, a series of poorly characterized proteins were also enriched in

one or both of the IPs: ECD, TTC27, TSSC4, EAPP, NCND, and ZNHIT2 (see Table S1 for the complete list of coprecipitated proteins). None of these proteins is part of the mature U5 snRNP (Makarov et al., 2002), and they thus represent potential U5 snRNP assembly factors.

To characterize in more detail the U5 assembly intermediates, we performed a SILAC IP with GFP-AAR2 as bait (Fig. 4 C and Table S1). The GFP-AAR2 fusion was stably expressed in HeLa cells and was detected in the cytoplasm and, to a lesser extent, in the nucleus (Fig. S2 B). GFP-AAR2 associated not only with PRPF8 and EFTUD2 as expected, but also with SNRNP200, which was surprising because the yeast homologues of AAR2 and SNRNP200 were shown to bind

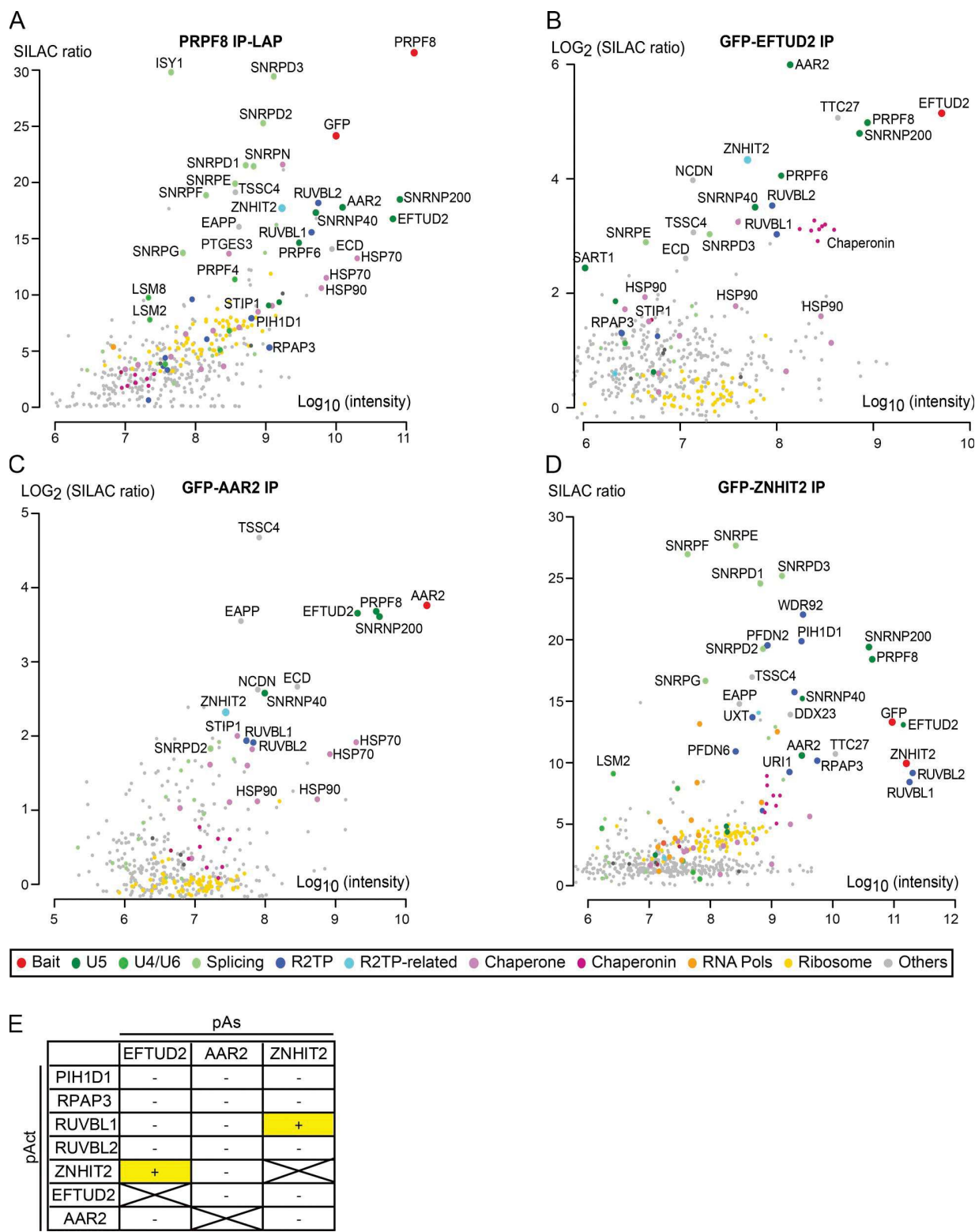


Figure 4. SILAC quantitative proteomic and yeast two-hybrid analyses of U5 snRNP proteins and assembly factors. (A) Proteomic analyses of the partners of PRPF8-WT-LAP. (B–D) SILAC proteomic analyses of GFP-EFTUD2 (B), GFP-AAR2 (C), or GFP-ZNHIT2 (D). Graphs display SILAC ratios (y axis) as a function of signal abundance (x axis) measured by quantitative proteomic analysis of extracts from HeLa cells expressing the indicated GFP-protein and immunoprecipitated with anti-GFP antibodies. SILAC ratios were calculated from a control IP done with parental HeLa cells. Each dot represents a protein and is color coded according to the classification shown below SILAC panels. The labeled dots were arbitrarily selected to highlight proteins relevant to this study. Significance values are given in Table S1. (E) Yeast two-hybrid analysis of interactions between R2TP, ZNHIT2, EFTUD2, and AAR2. The presence or absence of interactions is indicated by “+” and “-,” respectively, for the pairs of interactions tested.

PRPF8 in a mutually exclusive manner (Weber et al., 2011, 2013; Nguyen et al., 2013). Nevertheless, the GFP-AAR2 IP purified only a few other U5 proteins, which is in agreement with the idea that AAR2 binds PRPF8 mostly before its association with U5 snRNA. Interestingly, many chaperones and assembly factors found in the previous IPs were also associated with GFP-AAR2: HSP70, HSP90, STIP1, the R2TP components RUVBL1/2, as well as the putative assembly factors TSSC4, EAPP, NCDN, ECD, and ZNHIT2.

Next, we turned our attention to the R2TP complex. This complex functions as a cochaperone of HSP90, and it comprises four subunits: RPAP3, PIH1D1, and RUVBL1/2 (McKeegan et al., 2007; Boulon et al., 2012). The HSP90/R2TP system has been shown to participate in the assembly of multisubunit complexes including the U4 snRNP (Bizarro et al., 2015), small nucleolar ribonucleoprotein particles (snoRNPs; Boulon et al., 2008; Zhao et al., 2008), nuclear RNA polymerases (Boulon et al., 2010; Forget et al., 2010), and PIKKs-containing complexes (Hořejší et al., 2010, 2014; Kamano et al., 2013). The detection of R2TP subunits in association with PRPF8, EFTUD2, and AAR2 thus suggests that it could participate in the biogenesis of U5 snRNA. We have previously proposed that proteins of the ZNHIT family function as cofactors for the RUVBL1/2 ATPases of the HSP90/R2TP chaperone system (Bizarro et al., 2014; Verheggen et al., 2015). The presence of both ZNHIT2 and R2TP in the previous IPs thus suggested that ZNHIT2 could work as an R2TP cofactor specialized for U5 biogenesis. To test this idea, we investigated the partners of ZNHIT2 by performing a systematic pairwise two-hybrid analysis. This revealed interactions between ZNHIT2 and both RUVBL1 and EFTUD2 (Fig. 4 E). ZNHIT2 could thus potentially bridge R2TP with U5-specific proteins. Next, we stably expressed GFP-ZNHIT2 in HeLa cells (Fig. S2 C) and performed a SILAC proteomic analysis (Fig. 4 D and Table S1). Remarkably, the GFP-ZNHIT2 SILAC IP revealed a strong association of this factor with EFTUD2, PRPF8, and SNRNP200. Association of ZNHIT2 with PRPF8 was confirmed by coimmunoprecipitation (Fig. S2 D). GFP-ZNHIT2 further copurified large amounts of the R2TP complex, especially RUVBL1/2 and a set of prefoldins known to associate with R2TP (e.g., URI1, UXT, and PFDN6; Boulon et al., 2010; Cloutier and Coulombe, 2010). Consistent with a role in PRPF8 biogenesis, the GFP-ZNHIT2 SILAC IP was enriched for AAR2 and other putative assembly factors, including TTC27, TSSC4, EAPP, NCDN, and ECD. Interestingly, GFP-ZNHIT2 also copurified large amounts of Sm proteins, indicating that it remained present until the late stages of U5 snRNP biogenesis.

The HSP90/R2TP machinery binds unassembled cytoplasmic forms of PRPF8 and EFTUD2

PRPF8 is synthesized in the cytoplasm and must be transported to the nucleus to perform its role in splicing. To determine whether the interactions between R2TP and PRPF8 or EFTUD2 occur at an early cytoplasmic stage, we implemented a corecruitment assay using a fusion of RPAP3 with a fragment of p54, which targets the fusion protein to cytoplasmic P-bodies (Boulon et al., 2010). Using immunofluorescence (IF), we detected PRPF8 and GFP-AAR2 localizing in P-bodies that contained p54-RPAP3 (Figs. 5 A and S3 C) but not in P-bodies labeled by p54-KPNA3, a nuclear transport factor that served as a negative control (NC; Figs. 5 B and S3 C). Interestingly,

the interaction between p54-RPAP3 and PRPF8 also occurred when EFTUD2 was depleted, which was further confirmed by regular coimmunoprecipitation (Fig. S3 A). This demonstrated that the interaction between PRPF8 and RPAP3 can take place in the cytoplasm and is independent of EFTUD2.

Next, we tested the interaction of EFTUD2 and SNRNP200 with p54-RPAP3. EFTUD2 was weakly corecruited to p54-RPAP3 P-bodies under normal conditions, and this interaction increased after the KD of PRPF8 (Fig. 5, C and D), a result also confirmed by coimmunoprecipitations (Fig. S3 B). This indicated that EFTUD2 interacts with R2TP in the cytoplasm independently of PRPF8. In contrast, the SNRNP200-GFP fusion failed to be recruited with p54-RPAP3 even after KD of PRPF8, EFTUD2, or AAR2 (Figs. 5 E and S3 D). Furthermore, SNRNP200-GFP was not recruited on p54-ZNHIT2 P-bodies, whereas EFTUD2 and PRPF8 were (Fig. S3 E). The lack of cytoplasmic interaction of SNRNP200 with RPAP3 and ZNHIT2 suggests that SNRNP200 becomes stably associated into these complexes later in the nucleus.

Collectively, our data confirm that interactions of the R2TP complex with PRPF8 and EFTUD2 occur early on in the cytoplasm and are independent of each other. In contrast, recruitment of SNRNP200 occurs at a later step and most likely in the nucleus.

The PIH1D1 N-terminal domain coprecipitates several R2TP clients but not U5 proteins

These data indicate that EFTUD2 and PRPF8 make early interactions with R2TP. PIH1D1 is a client-binding subunit of R2TP, and its N-terminal domain binds phosphorylated peptides with a DSDD(D/E) consensus sequence (Hořejší et al., 2014). EFTUD2 possesses a conserved phosphorylated DSDED sequence at its N terminus (Hornbeck et al., 2015), and it was shown to make phosphorylation-dependent interactions with PIH1D1 *in vitro* (Hořejší et al., 2014). The N-terminal domain of PIH1D1 could thus recruit EFTUD2 to R2TP via an interaction with its DSDED motif. To test whether the PIH1D1 N terminus brings EFTUD2 into the R2TP complex and to determine the role of the DSDED motif, we analyzed the interactomes of (i) the PIH1D1 N-terminal domain and (ii) EFTUD2 with a mutated DSDED motif.

We fused the N-terminal domain of PIH1D1 to GFP, stably expressed it in HeLa cells, and performed a SILAC proteomic analysis (Fig. 6 A). The N terminus of PIH1D1 was not incorporated into R2TP because it did not copurify other subunits of this complex, which is in agreement with previous studies (Hořejší et al., 2014; Pal et al., 2014). Although the PIH1D1 N-terminal domain bound tightly to some known R2TP substrates—two box C/D core proteins (SNU13 and FBL) and factors involved in RNA pol II assembly (polymerase subunits RPAP2, GPN1, and GPN3)—we did not detect any enrichment for EFTUD2 or other U5 proteins. Interestingly, the PIH1D1 N terminus also bound two complexes not previously known to associate with R2TP: a SEC16A complex containing SEC13 and USO1 and also all the three subunits of the tuberous sclerosis complex (TSC; TSC1, TSC2, and TBC1D7), which is a major regulator of mTOR (Dibble and Cantley, 2015). To further test whether PIH1D1 is important for the recruitment of U5 proteins to the R2TP complex, we used siRNA to reduce PIH1D1 expression in the PRPF8-LAP cell line and immunoprecipitated PRPF8-LAP with anti-GFP antibodies (Fig. 6 B).

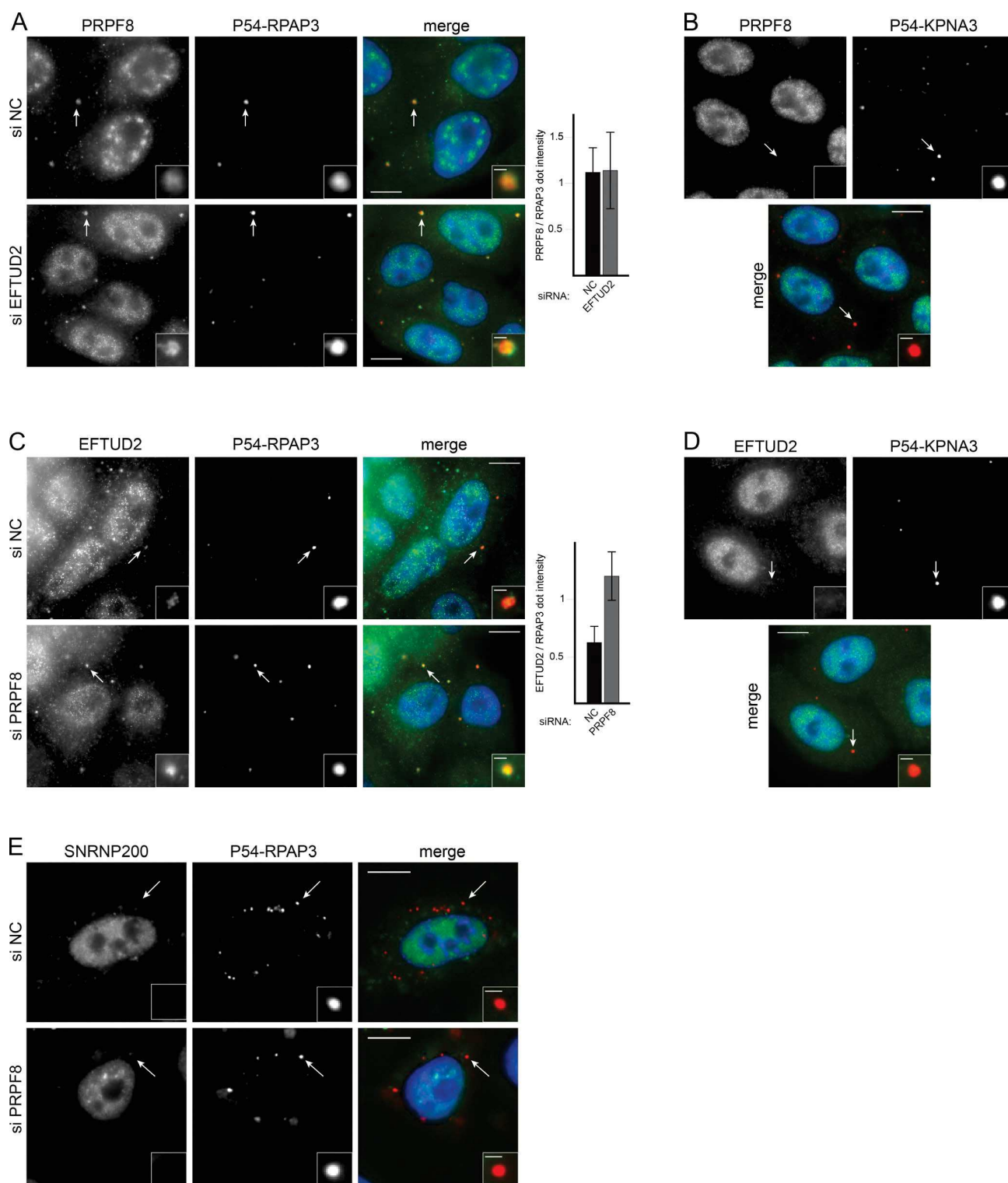


Figure 5. R2TP interacts with EFTUD2 and PRPF8 in the cytoplasm. (A and B) Analysis of the interaction between PRPF8 and RPAP3 with a cytoplasmic corecruitment assay. (A) HeLa cells stably expressing a p54-DsRed2-RPAP3 fusion and treated with a siRNA against EFTUD2 or NC siRNA (siNC). Green/left panels, PRPF8 as detected by IF; red/middle panels, p54-DsRed2-RPAP3; blue, DAPI. A quantification of green over red signals in dots is shown on the right. (B) Same as in A, except that cells express p54-DsRed2-KPNA3 as controls. (C and D) Interaction between RPAP3 and EFTUD2 tested with a cytoplasmic corecruitment assay with and without PRPF8 KD. (C) Legend is as in A. (D) control with cells expressing p54-DsRed2-KPNA3. Values are means calculated from >25 dots. Error bars indicate SD. (E) Interaction between SNRNP200 and RPAP3 tested with a cytoplasmic corecruitment assay with and without PRPF8 KD. Legend is as in A. Insets are magnified images of the dots marked by the white arrows. Bars: (main images) 10 μ m; (insets) 1 μ m.

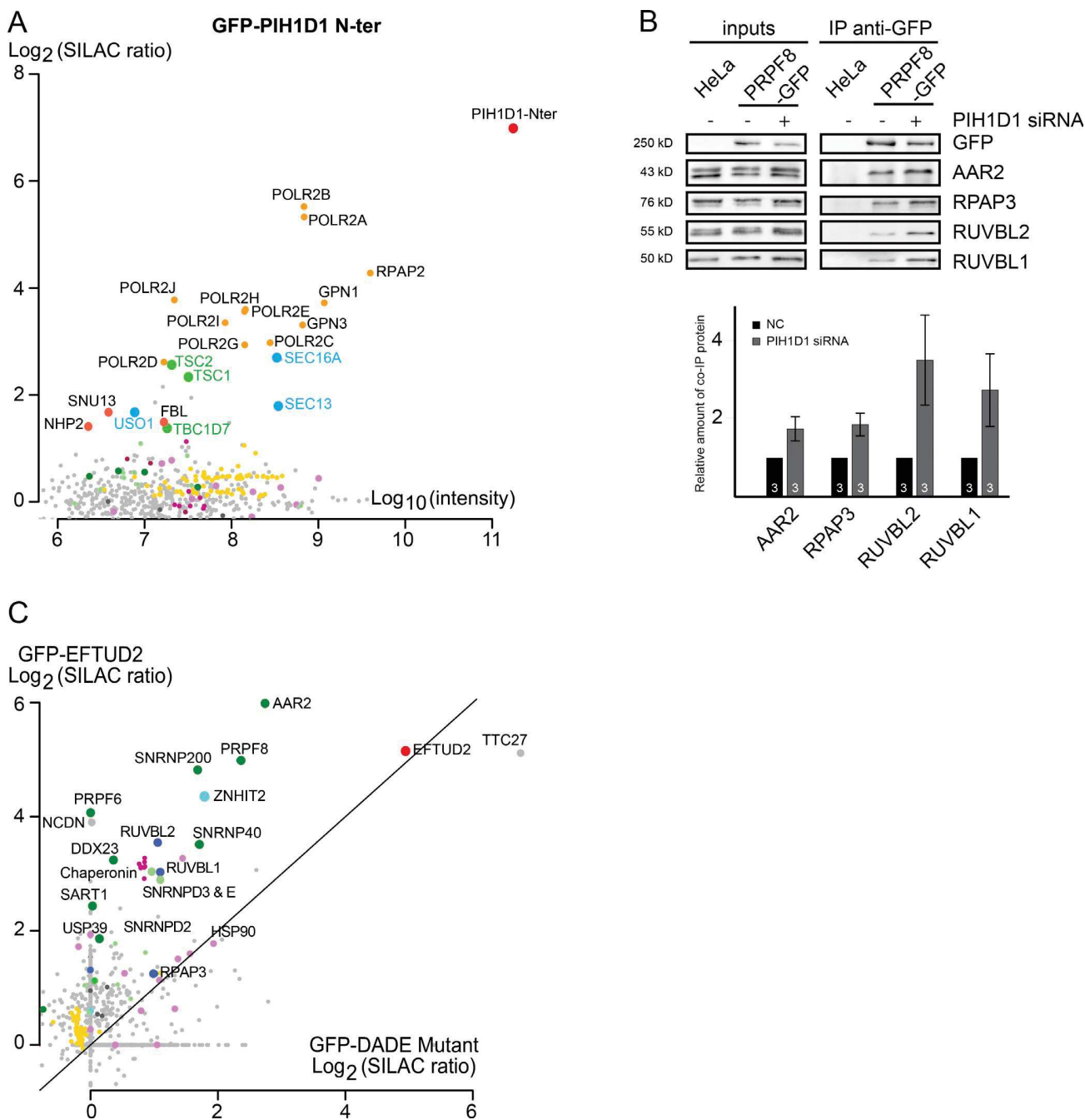


Figure 6. PIH1D1 is not essential for PRPF8-R2TP interaction. (A) Proteomic analyses of the partners of the N-terminal domain of PIH1D1 tagged with GFP. The graph displays SILAC ratios (y axis) as a function of signal abundance (x axis) measured by a quantitative proteomic of extracts from HeLa cells expressing the GFP-PIH1D1 N-terminal domain and immunoprecipitated with anti-GFP antibody. SILAC ratios are calculated from a control IP done with parental cells. Each dot represents a protein and is color-coded according to the classification shown in Fig. 4. Significance values are given in Table S1. (B) Changes in the partners of PRPF8 upon depletion of PIH1D1. The top image represents WBs made with extracts of cells expressing PRPF8-WT-LAP and treated with PIH1D1 or control siRNA (lanes “+” and “-,” respectively) and then immunoprecipitated with anti-GFP antibody (IP anti-GFP lane). Inputs contain 2% of the materials in the IP, and the antibodies used to probe the WB are indicated at the right. The bottom graph displays the amount of the protein present in the pellet and normalized, first to the amount of copelleted GFP and then to the same ratio measured in the NC siRNA. Values were measured with ImageJ and are the means of three experiments. The exact number of each experiment is indicated in each column. Error bars indicate SEM. (C) Comparison of GFP-EFTUD2 WT and the DADE mutant interactomes as detected by SILAC IPs. Log_2 of SILAC ratios of the two proteins are plotted against each other.

The results showed that the interactions of PRPF8 with R2TP and AAR2 increased in the absence of PIH1D1. This indicates that although PIH1D1 is not required to recruit PRPF8 to the R2TP, it may be important for the release of AAR2 and thus the maturation of PRPF8.

The DSEDED motif of EFTUD2 is important for the assembly of U5 snRNP

To study the role of the DSEDED motif in EFTUD2, we generated a phospho-dead mutant of this motif (S19A; DADE mutant). This mutant was then fused to GFP and stably expressed in HeLa cells. Interestingly, the mutant displayed an altered localization with increased levels in the cytoplasm and lower accumulation in the nucleus (Fig. S2 F). We then performed a quantitative SILAC proteomic analysis of the mutant (Fig. S2 E). Direct comparison with WT GFP-EFTUD2 revealed that the DADE mutant had a dramatically altered interactome (Fig. 6 C). First, it bound more strongly to the poorly characterized factor TTC27. Second, it bound less strongly to a set of factors that included Sm proteins, U5-specific proteins (PRPF8, SNRNP200, and SNRNP40), and proteins found in U5 assembly intermediates (AAR2, RUVBL1/2, ZNHIT2, and Chaperonin). Third, it lost interactions with another set of U5-specific proteins (PRPF6 and DDX23) as well as with U4/U6 and U4/U6.U5 proteins (SART1, USP39, and PRPF4). The proteomic data thus indicated major defects in the formation of snRNP particles and pointed to the essential role of the phosphorylated DSEDED motif of EFTUD2 during the biogenesis of U5 and the tri-snRNP.

Collectively, our data show two partially contradictory observations: (i) that the PIH1D1 N-terminal domain is not sufficient to stably bind EFTUD2 and (ii) that the DSEDED motif of EFTUD2 is important for U5 maturation. In vitro, the affinity of the PIH1D1 N-terminal domain with the EFTUD2 phosphorylated peptide is ~10 times weaker than previously published PIH1D1 phosphointeractions (Hořejší et al., 2014; Pal et al., 2014; Smerdon, S., personal communication). This may be insufficient to ensure a stable binding in vivo, and additional factors such as ZNHIT2 may be essential to secure the interaction between EFTUD2 and R2TP. A similar situation has been described for ECD binding to R2TP when two independent interaction sites (one PIH1D1-dependent and one PIH1D1-independent) were together necessary for a stable ECD-R2TP binding (Mir et al., 2015). The phosphorylated DSEDED motif may therefore stabilize EFTUD2 binding to R2TP after its initial recruitment and/or may trigger a conformational change important for later assembly steps of U5 snRNP. We can also not formally exclude that the effect of the S→A mutation in the DSEDED motif is independent of R2TP.

The R2TP complex is important for the stability of EFTUD2 and U5 snRNP maturation

To confirm that R2TP is involved in EFTUD2 maturation, we knocked down its individual components with siRNAs and measured the level of newly synthesized EFTUD2. To this end, we fused EFTUD2 with firefly luciferase (FFL) and transiently transfected the corresponding expression vector in HeLa cells. This transient expression system ensured that the analysis focused on newly synthesized proteins and not on proteins that had been already incorporated into U5 snRNP (Boulon et al., 2008; Bizarro et al., 2014). KD of ZNHIT2, PIH1D1, and to a

lesser extent RUVBL2 reduced the levels of FFL-EFTUD2 but not of FFL alone, which was used as a control (Fig. 7 A). This indicated that ZNHIT2 and several subunits of the R2TP complex were important for the stability of the nascent EFTUD2 protein.

A previous study has shown that defects in U5 snRNP maturation cause the accumulation of U5 snRNA in CBs (Novotný et al., 2015). To confirm the role of R2TP in U5 biogenesis, we treated HeLa cells with siRNAs targeting RUVBL1 and 2 and determined the intracellular localization of U5 snRNA. Depleted cells displayed a clear accumulation of U5 snRNA in CBs (Fig. 7 B), thus confirming that these key R2TP components are required for the maturation of U5 snRNP.

HSP90 stabilizes cytoplasmic unassembled PRPF8

The R2TP complex is a cochaperone for HSP90, and the interactions described in this study suggest that HSP90 could be involved in the biogenesis of PRPF8 and other U5-specific proteins. To test whether PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 were clients of HSP90, we inhibited its activity using geldanamycin (GA). This locks HSP90 in a closed state and usually results in client degradation (Whitesell et al., 1994). HSP90 inhibition reduced the levels of PRPF8 and SNRNP200, but not of EFTUD2 (Fig. 8 A). This suggests that PRPF8 and SNRNP200 are potential client proteins of HSP90.

To determine whether HSP90 stabilizes nuclear or cytoplasmic forms of PRPF8, we performed the same corecruitment assay as in Fig. 5 A but in the presence of GA. Interestingly, although GA treatment had no obvious effect on the nuclear pool of PRPF8 (Fig. 8 B and unpublished data), it reduced the amount of PRPF8 present in p54-RPAP3 P-bodies (Fig. 8, B and C). These data suggest that HSP90 activity is required to stabilize cytoplasmic forms of PRPF8.

The R2TP complex associates with PRPF8 assembly-deficient mutants and sequesters them in the cytoplasm

The aforementioned data indicate that HSP90 and its R2TP cochaperone are involved in the biogenesis of the U5-specific proteins PRPF8 and EFTUD2. At the same time, we have shown that RP mutations stall PRPF8 maturation and impair its interaction with SNRNP200 and U5 snRNA (Fig. 3). To test whether R2TP associates with the stalled RP mutants, we used PRPF8-LAP cell lines. We focused on mutations S2118F and H2309R, which exhibited the strongest assembly phenotype. As controls, we used WT PRPF8 and the F2314L mutant, both of which incorporate into the tri-snRNP. S2118F and H2309R mutations both increased the association of PRPF8 with R2TP (Fig. 9, A and B) and also with ZNHIT2 (Fig. 9, C and D). These results show that R2TP binds more strongly to PRPF8 assembly-deficient mutants.

PRPF8 contains a putative nuclear localization signal at its N terminus. However, RP mutants are not efficiently imported to the nucleus, resulting in a significant fraction remaining in the cytoplasm where the interaction with R2TP occurs (Fig. 1, C and D; and Fig. 5 A). To test whether R2TP is involved in the cytoplasmic accumulation of PRPF8 mutants, we depleted RUVBL1 or 2 in the S2118F-LAP cell line that exhibited the strongest accumulation in the cytoplasm (Fig. 1 D). Both KDs resulted in the relocalization of the S2118F-LAP protein to the nucleus (Fig. 9, E and F). These findings suggest that the HSP90/R2TP chaperone complex retains assembly-defective

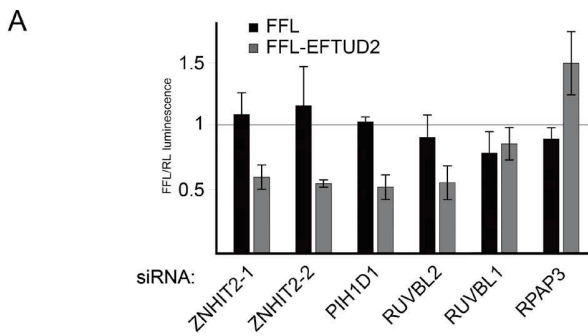
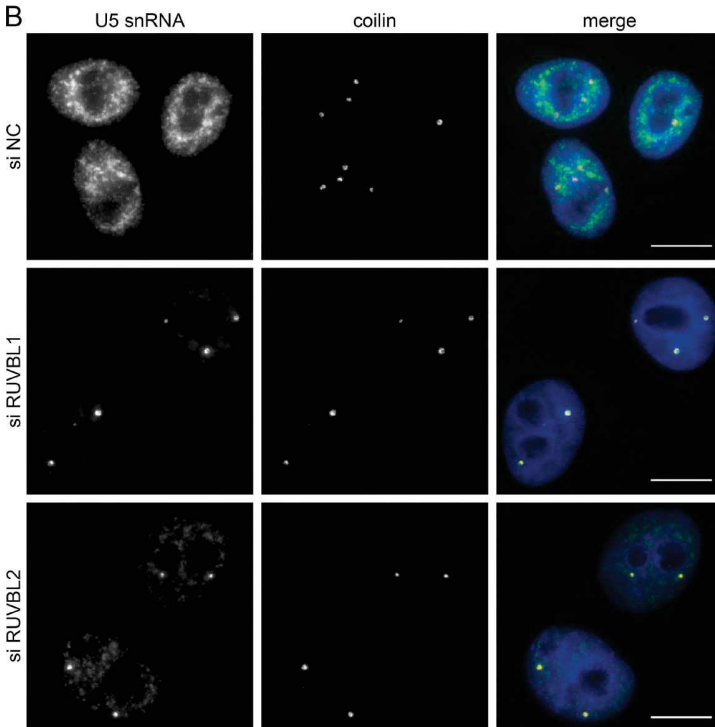


Figure 7. R2TP components are important for EFTUD2 stability and U5 snRNP maturation. (A) Levels of newly synthesized FFL-EFTUD2 after KD of R2TP and ZNHIT2. The graph displays FFL activity measured in extracts of HeLa cells transiently transfected with the indicated plasmid and siRNAs and then normalized first to RL activity (expressed from a cotransfected plasmid) and then to the ratio obtained with control siRNAs. Values are the means of at least three experiments, each done in triplicate. Error bars indicate SEM. (B) U5 snRNA accumulation in CBs after KD of RUVBL1/2. HeLa cells were treated with siRNAs against RUVBL1/2 or an NC siRNA. Green/left panels, U5 snRNA was detected by FISH; red/middle panels, coilin detected by IF; blue, DAPI. Bars, 10 μ m.



PRPF8 mutants in the cytoplasm and thus performs an early discrimination of WT versus mutant PRPF8 proteins.

Discussion

PRPF8 RP mutants are defective in snRNP assembly and splicing

RP is a progressive degenerative disease that can be caused by mutations in genes coding for snRNP-specific proteins. In this study, we studied eight point mutations in *PRPF8*. None of the mutants were able to rescue the splicing deficiency caused by the depletion of the endogenous PRPF8 protein (Figs. 2 and S1). For six out of the eight analyzed mutations, this could be explained by an inhibition of tri-snRNP formation (Fig. 3, A and B). However, this is not a general case because the Y2334N and F2314L mutations in PRPF8 do not block snRNP biogenesis while affecting splicing, similar to two RP mutations in the *SNRNP200* gene (Cvačková et al., 2014). The F2314L mutation weakens association with the essential helicase SNRNP200, which could explain the splicing defects. The Y2334 mutant binds SNRNP200 as efficiently as WT. This mutation is in the C-terminal tail that inhibits SNRNP200 helicase

activity (Mozaffari-Jovin et al., 2013), and it may thus affect the proper regulation of SNRNP200 during spliceosome activation. Based on these findings, we conclude that most mutations in *PRPF8* exhibit a phenotype similar to RP mutations in other snRNP genes, which often reduce snRNP assembly and, consequently, splicing (Gonzalez-Santos et al., 2008; Huranová et al., 2009; Tanackovic et al., 2011; Linder et al., 2014).

AAR2 identifies a PRPF8 assembly intermediate containing EFTUD2 and SNRNP200

Considering the essential function of PRPF8 and U5 snRNP during splicing, surprisingly little is known about their biogenesis in metazoans. In yeast, Prp8 first interacts with Aar2 and Snu114, and this complex then joins the core U5 snRNP, followed by the replacement of Aar2 with the helicase Brr2 (Gottschalk et al., 2001; Boon et al., 2007). In the human pathway characterized here, PRPF8, AAR2, and EFTUD2 also make an intermediate assembly complex. GFP-AAR2 IP copurified large amounts of PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 but only small amounts of Sm proteins or other U5-specific proteins (Fig. 4 C). In addition, RP mutants stalled in the intermediate assembly complexes with AAR2 do not associ-

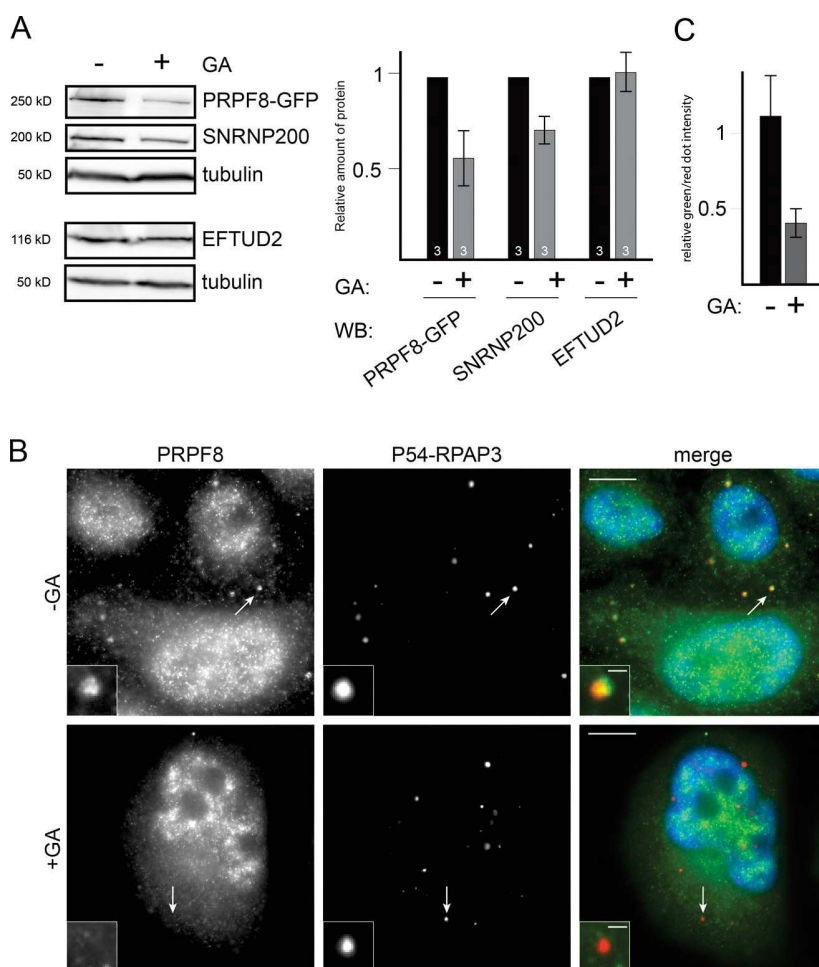


Figure 8. HSP90 is required for PRPF8 stability in the cytoplasm. (A) Effect of GA on the levels of U5 proteins. Left images represent WBs made with extracts of HeLa cells expressing WT PRPF8-LAP and treated (+) or untreated (-) with GA. WBs were probed with the antibodies indicated at the right. On the right is a quantification of the signals as measured with ImageJ and expressed as percentages of the untreated controls. Values are means of three experiments. (B) Effect of GA on the levels of RPAP3-bound cytoplasmic PRPF8. Legend as in Fig. 5, except cells were treated with GA. Insets are magnified images of the dots marked by the white arrows. Bars: (main images) 10 μ m; (insets) 1 μ m. (C) Quantification of the green (PRPF8) and red (p54-RPAP3) signals in 30 dots shown at B. Error bars indicate SEM.

ate with Sm proteins (Fig. 3, C–E). These findings collectively suggest that AAR2-containing intermediates are loosely or not associated with U5 snRNA.

ZNHIT2 and the HSP90/R2TP chaperone system are involved in the assembly of U5-specific proteins

Our SILAC IPs identified a set of proteins that are not present in the mature U5 snRNP (TTC27, TSSC4, EAPP, NCDN, and ECD). These factors might thus represent additional U5 assembly factors as proposed for the ECD homologue in flies (Claudius et al., 2014). Most importantly, these IPs identified the HSP90/R2TP complex and its cofactor ZNHIT2 as key U5 snRNP assembly factors (Fig. 4, A and B). This chaperone machinery was previously found to be involved in the snoRNP assembly as well as in the assembly of U4-specific proteins (Bizarro et al., 2014, 2015). In this study, we show that the U5-specific proteins PRPF8 and EFTUD2 interact *in vivo* with HSP90 and R2TP and that these interactions arise early in the cytoplasm. Functional experiments demonstrate that both HSP90 and R2TP are required for the biogenesis of U5 snRNP. First, inhibiting HSP90 leads to decreased levels of PRPF8 and SNRNP200. Second, KD of R2TP components reduces the amount of newly synthesized EFTUD2 and also leads to the accumulation of U5 in CB, a signature of assembly defects (Novotný et al., 2015).

Based on the available data, we propose the following model (Fig. 10). First, the HSP90/R2TP chaperone independently

recruits PRPF8 and EFTUD2 and promotes the assembly of a cytoplasmic complex containing these proteins in association with AAR2, ZNHIT2, and other factors. SNRNP200 does not interact with this complex and would be recruited later in the nucleus. Because U5 snRNA accumulates in CBs when PRPF8 is absent (Novotný et al., 2015), it is likely that the preassembly complex interacts with U5 snRNA in CBs, where final maturation steps would take place. Recycling of U5 snRNP and reformation of the U4/U6.U5 tri-snRNP have also been suggested to occur in CBs (Staněk et al., 2008). In yeast, this process also requires Aar2 (Gottschalk et al., 2001). In future studies, it will be interesting to determine whether the R2TP complex is also involved in snRNP recycling.

Client selection and function of the R2TP complex

We show here that R2TP makes independent interactions with EFTUD2 and PRPF8, thereby bringing these proteins together and providing a simple way to promote complex assembly. It is, however, less clear how these U5 proteins are recruited to R2TP. It was previously shown that the N-terminal domain of PIH1D1 binds phosphorylated DSDD(D/E) peptides, and it was proposed that this could be a determinant for R2TP client selection (Hořejší et al., 2014). We did not detect interaction between PIH1D1 N-terminal and U5 proteins, including EFTUD2, even though this protein carries a phosphorylated DSDED motif and binds PIH1D1 in a phospho-dependent manner *in vitro* (Hořejší

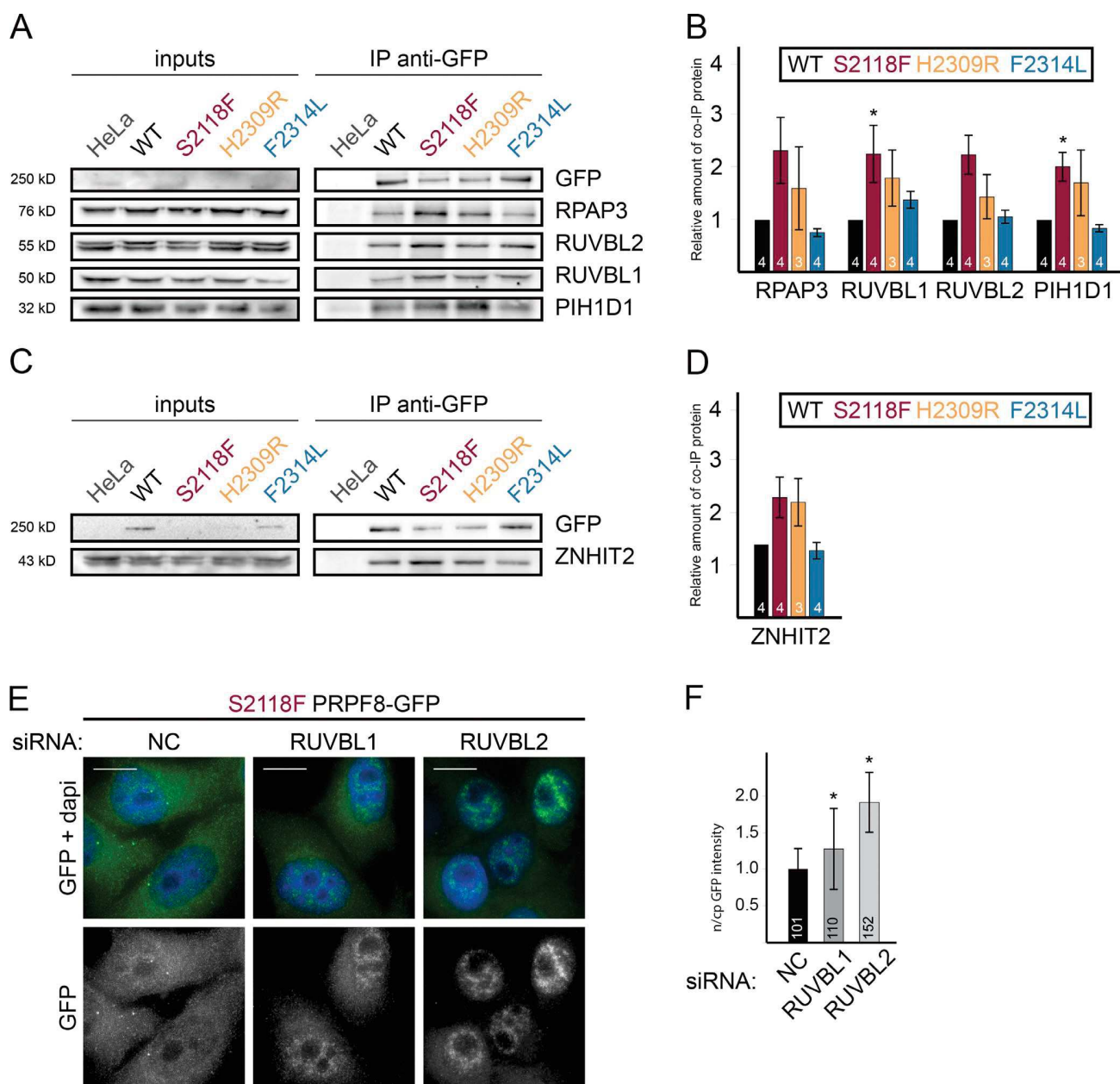


Figure 9. The R2TP complex binds more strongly to RP PRPF8 assembly-deficient mutants and is required for their cytoplasmic retention. (A) WB made with extracts of cells expressing the indicated PRPF8-LAP variants (input lane) and immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. Inputs contain 2% of the materials in the IP, and the antibodies used to probe the WB are indicated at the right. (B) The graph displays the amount of the protein present in the pellet and normalized first to the amount of copelleted GFP and then to the same ratio measured in the NC siRNA. Values were measured with ImageJ and are the means of 3–4 experiments (indicated in each bar). (C and D) Increased binding of ZNHIT2 to PRPF8 RP mutants. Legend is as in A and B. Error bars indicate SEM. (E and F) Relocalization of PRPF8-S2118F-LAP upon RUVBL1/2 KDs. (E) HeLa cells stably expressing PRPF8-S2118F-LAP fusion protein and treated with siRNAs against RUVBL1/2 or a control siRNA. Green/bottom panels, PRPF8-LAP-S2118F; blue, DAPI. Bars, 10 μ m. (F) The ratio of nuclear and cytoplasmic (n/cp) GFP signal intensity was quantified using ImageJ software. The means of the measurement of 101–152 cells along with the SD is shown. The exact number of each experiment is indicated in each column. *, $P < 0.05$, as measured with a t test comparing the indicated sample and the control siRNA.

et al., 2014). Nevertheless, the N-terminal domain of PIH1D1 recruits some R2TP clients, e.g., subunits of RNA pol II and box C/D snoRNPs (Fig. 6 A). Interestingly, these factors lack known phosphorylated DSDD(D/E) motifs and may thus interact with PIH1D1 using other interaction surfaces.

Mutation of the phosphoserine in the EFTUD2 DSDED motif affects the composition of U5 snRNP, indicating that it

is functionally relevant. However, the binding affinity of the EFTUD2 phosphopeptide may be too weak to ensure a stable *in vivo* binding to the PIH1D1 N-terminal domain, and additional bridging factors such as ZNHIT2 may be essential to secure this interaction. ZNHIT2 belongs to the Zinc-Finger histidine triad motif (HIT) protein family, which contains six members in humans. These proteins have been recently pro-

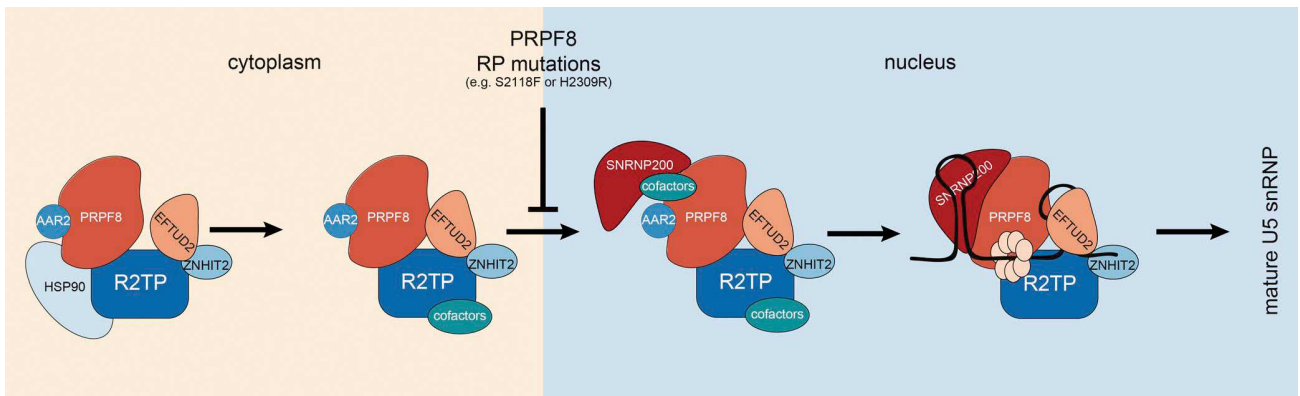


Figure 10. **Model for the assembly of U5-specific proteins.** The HSP90/R2TP chaperone recruits PRPF8 and EFTUD2 rapidly after their synthesis and promotes the formation of a cytoplasmic assembly intermediate complex containing AAR2, ZNHIT2, and possibly other factors. This complex translocates to the nucleus and binds SNRNP200. AAR2 is released upon binding of U5 snRNA, and maturation is complete after the release of ZNHIT2 and R2TP proteins.

posed to function as cofactors for the RUVBL1/2 ATPases, and they may target them to specific substrates (Verheggen et al., 2015). Our two-hybrid analysis demonstrates that ZNHIT2 forms a bridging interaction between EFTUD2 and RUVBL1 (Fig. 4 E) and is in agreement with this hypothesis, which suggests that ZNHIT2 targets RUVBL1/2 toward EFTUD2.

The mechanism of action of R2TP is still unclear. In the case of box C/D snoRNPs, we proposed that R2TP recruits snoRNP subunits and then transfers RUVBL1/2 from R2TP to these proteins, possibly in an ATP- and ZNHIT-dependent manner (Bizarro et al., 2014). Indeed, ATP dissociates RUVBL1/2 from R2TP, whereas it promotes binding to snoRNP proteins and to ZNHIT6, an essential C/D assembly factor (McKeegan et al., 2007). A similar model could be proposed in the case of U5 snRNP (Fig. 10) because our proteomic data indicate a much tighter binding of U5 proteins to ZNHIT2 and RUVBL1/2 than to the other R2TP components. In the assembly intermediates, the role of the RUVBL proteins could be to maintain together U5 subunits and/or to dissociate assembly factors at late assembly stages, as proposed for snoRNPs (Machado-Pinilla et al., 2012; Bizarro et al., 2014).

The HSP90/R2TP machinery performs a quality control of PRPF8

Depletion of U5 proteins and PRPF8 RP mutation both increase the association of PRPF8 and EFTUD2 with R2TP. Furthermore, assembly-defective PRPF8 RP mutants accumulate in the cytoplasm, and one such mutant relocates to the nucleus upon KD of RUVBL1 or 2 (Fig. 9, E and F). These data suggest a model in which incomplete assembly intermediates remain associated with R2TP in the cytoplasm, and only the properly formed complex translocates to the nucleus. The R2TP machinery would thus provide a quality control to ensure that only correctly folded proteins and assembled complexes are imported to the nucleus, as proposed previously for RNA pol II (Boulon et al., 2010).

Interestingly, the pulldown of the N-terminal domain of PIH1D1 revealed a strong interaction with the TSC complex. This complex is a tumor suppressor that integrates extracellular signals and energy availability to regulate mTORC1 (Islam and Roach, 2015). The TSC complex could be another R2TP client but could also regulate it. This raises the fascinating possibility that R2TP could link energy and cell growth signals to RNP biogenesis.

Materials and methods

Cell culture, siRNA, and plasmid transfection

HeLa cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in DMEM containing 4.5 g glucose per liter (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (Biochrom AG) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

For KDs, siRNAs were introduced into cells with oligofectamine transfection reagent (Invitrogen) or JetPRIME (Polyplus) according to the manufacturer's protocol, and cells were then grown for 48 to 96 h. KD efficiencies were assayed by WB (Fig. S4). The siRNA against PRPF8 (5'-CCUGUAUGCCUGACCGUUUTT-3') was designed against the sequence around the STOP codon and did not target the PRPF8-LAP fusion used in the BAC cell lines (Novotný et al., 2015). Additional KDs were performed using the following siRNAs: PRPF8 (5'-CCUGUAUGCCUGACCGUUUTT-3'), PIH1D1 (5'-UUCUUAGCCGCCUCUCCTT-3'), mixture of siRNA PIH1D1-1 (5'-GAAUGGAAAUGUAGUCUUATT-3') and PIH1D1-2 (5'-GAG AAGAGGCGUCUGGCUUTT-3'), RUVBL1 (5'-CCUUGAAGCUG AAGAGUAUTT-3'), RUVBL2 (5'-AGGAAGAAGAUGUGGAGA UTT-3'), RPAP3-1 (5'-CAACAGAAGGAGAGCGAAATT-3'), RPAP3-2 (5'-GGACUAUCUUUGAACAUAA-3'), EFTUD2 (5'-CUAUACUG ACAUCCUCUUCTT-3'), AAR2 (5'-UUGUCUCCCAAGACAACU UTT-3'), SNRNP200 (5'-GUGAUUCAGAUUGAUCCUUTT-3'), ZNHIT2-1 (5'-CGGUAAGAUGAUCUCGUTT-3'), and ZNHIT2-2 (5'-CUGGUCAUUAAUAAAGCUGTT-3'). As a control, we used scrambled siRNA (5'-GCUAAUACACUAGGCUACGTT-3') or NC #5 siRNA (Thermo Fisher Scientific).

Plasmids were transfected into cells using X-tremeGENE HP (Roche) according to manufacturer's protocol, and cells were analyzed 24 h after transfection. For splicing experiments, we used a β -globin reporter derived from the E3 vector containing the β -globin gene (Darzacq et al., 2006), a gift from Y. Shav-Tal (Bar-Ilan University, Tel Aviv, Israel). We deleted the second β -globin intron (nucleotides 496–1,536). These changes were confirmed by sequencing. Retina-specific reporters, RHO, ROM1, and FSCN2 (Yuan et al., 2005; Mordes et al., 2007) were provided by J. Wu (Northwestern University, Chicago, IL).

For IP and SILAC IP experiments, GFP-tagged proteins were stably expressed in HeLa cells using the Flp-In system, and stable clones were maintained in DMEM with 0.04 μ g/ml hygromycin B. HeLa clones expressing GFP-AAR2, GFP-EFTUD2, GFP-ZNHIT2, and GFP-PIH1D1 N-terminal (aa 1–180) were used for SILAC IP. For core-cruitment assays, we used HeLa cells that stably expressed p54-DsRed-RPAP3. For HSP90 inhibition, cells were treated with 2 μ M GA for 16 h.

Plasmids

DNA cloning was performed with the Gateway system (Invitrogen). The N-terminal fragment of PIH1D1 was generated by PCR amplification (nucleotides 1–540) and cloned in pcDNA5-GFP using Gateway technology. GFP-EFTUD2-DADE was generated by oligonucleotide-directed mutagenesis using the QuikChange II kit (Agilent Technologies) followed by Gateway cloning.

BAC recombineering

The BAC clone containing the *PRPF8* gene tagged with the LAP tag (containing GFP) was provided by I. Poser (Poser et al., 2008). All RP-related mutations investigated in this study were prepared by Red/ET recombineering using the Counter-Selection BAC Modification kit (Gene Bridges). The selection marker cassette (RpsI-amp) was PCR amplified using *PRPF8* specific primers carrying 50 nt of homology surrounding the sequence to be modified and inserted into the target sequence by DNA recombination. In the second step, the cassette was replaced with a modified version of the target sequence containing the appropriate point mutation using recombination. The synthesis of individual mutations was verified by sequencing. BAC DNA was transfected into HeLa cells using X-tremeGENE HP (Roche) according to the manufacturer's protocol. Stable cell lines were selected with G418 (Gibco) and sorted by a cell sorter.

Antibodies

We used the following primary antibodies for IF, WB, or IP: rabbit anti-PRPF8 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Thermo Fisher Scientific; Bethyl Laboratories, Inc.), rabbit anti-SNRNP200 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-C20orf4 35–50 (AAR2 splicing factor homologue; Sigma-Aldrich), rabbit anti-PRPF6 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit anti-EFTUD2 (Thermo Fisher Scientific; Bethyl Laboratories, Inc.), mouse anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit anti-GFP (Torrey Pines Biolabs), mouse anti-RUVBL1 (Abcam), rabbit anti-RUVBL1 (Proteintech), rabbit anti-RUVBL2 (GeneTex; Proteintech), mouse anti-PIH1D1 (Abcam), rabbit anti-RPAP3 (Abcam), rabbit anti-ZNHIT2 (Abcam), rabbit anti-GAPDH (Abcam), anti-coilin (5P10) mouse antibody (provided by M. Carmo-Fonseca, Institute of Molecular Medicine, Lisbon, Portugal; Almeida et al., 1998), goat anti-GFP (provided by D. Drechsler, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany), rabbit anti-EFTUD2 and anti-PRPF31 (provided by R. Lüthmann, Max Planck Institute, Göttingen, Germany), and mouse anti-tubulin (provided by P. Dráber; Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). The anti-Sm antibody Y12 was produced from a hybridoma cell line (a gift from K. Neugebauer, Yale University, New Haven, CT) at the Antibody Facility of the Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences. For RPAP3 IP, the anti-RPAP3 antibody was produced from the hybridoma cell line 19B11.

For WB, we used secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). For IF, we used secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled to FITC (Sigma-Aldrich) or DyLight488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

IF and light microscopy

Cells grown on coverslips were washed with PBS and fixed with 4% (weight/volume) paraformaldehyde/Pipes for 10–20 min at RT. Permeabilization was done in 0.1–0.2% Triton X-100 in PBS for 5–10 min at RT. For IF, coverslips were incubated with primary and secondary antibodies. Coverslips were mounted with Fluoromount G (Southern Biotech) containing DAPI for DNA staining or with Vectashield (Vector Laboratories). snRNAs were visualized by FISH as previously described (Novotný et al., 2015).

Images were collected on a DeltaVision microscope system (Applied Precision Ltd.) coupled with a microscope (IX70; Olympus) equipped with a 63× 1.42 NA oil immersion objective and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics; Princeton Instruments) and the acquisition software SoftWoRx (Applied Precision Ltd.). Stacks of 20 z sections with 200-nm z steps were taken per sample at 37°C and subjected to mathematical deconvolution using SoftWoRx software. Maximal projections of deconvolved pictures were done by SoftWoRx and are presented. Nucleocytoplasmic distribution was analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health). Between 52 and 125 cells were analyzed per mutant, and the mean and SEM are shown in the graphs. Alternatively, for corecruitment assays, cells were observed using a wide-field fluorescence microscope with a 63× 1.4 NA oil objective (DMRA; Leica Microsystems; at RT). Images were acquired with a CoolSNAP HQ2 camera. Red/green quantification was performed on red and green images concomitantly using Metamorph (Molecular Devices).

Time-lapse microscopy

For live-cell measurements, cells were cultured on glass-bottomed Petri dishes (MatTek Corporation). Experiments were performed on a DeltaVision microscope system equipped with a chamber for live-cell imaging controlling temperature and CO₂ concentration. Other specifications were identical as in the previous section. Cycloheximide was added to the medium (final concentration 30 µg/ml), and GFP fluorescence was recorded at 15-min intervals over an 8-h period. Three experiments, each containing 8–10 cells per cell line, were analyzed, and means are shown in the graphs.

RT-PCR and quantitative PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. When required, RNAs were treated with TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific). cDNAs were synthesized using SuperScript III Reverse Transcription (Invitrogen) and random hexamers. Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific) was used for PCR reactions.

PCR products were separated on 3% agarose gel, and the intensity of individual bands was determined using ImageJ software. Quantitative PCR was performed using SYBR green on a LightCycler 480 System (Roche). The reaction volume of 5 µl contained 2 µl of template cDNA (diluted to 1:10) and 500 nM of each primer. Denaturation at 95°C for 7 min was followed by 40 cycles for 20 s at 95°C, 20 s at 61°C, and 35 s at 72°C. Splicing efficiency (ratio mRNA/pre-mRNA) was calculated as $2^{(Ct[\text{pre-mRNA}] - Ct[\text{mRNA}])}$. The following primers were used for RT-PCR and quantitative PCR: β -globin forward, 5'-CAAGGTGAACGTGGA-3'; β -globin reverse, 5'-GGACAGATCCCCAAAGGACT-3'; RHO forward, 5'-CGGAGGTCAACAACGAGTCT-3'; RHO reverse, 5'-TCTCTGCCTCTGTGTGGTG-3'; FSCN2 forward, 5'-TGCCAACACCATGTTGAGA-3'; FSCN2 reverse, 5'-GCTTGAGGGTGAACCTCTTCG-3'; ROM1 forward, 5'-CAACCCAA CCAAACCTCTG-3'; ROM1 reverse, 5'-ATAGCCCTGGGTCTCTCCTC-3'; pre-LDHA forward, 5'-CCTTTCAACTCTCTTTTGGCA ACC-3'; pre-LDHA reverse, 5'-AATCTTATCTGGGGGGTCTGTTC-3'; mLdHA forward, 5'-AGAACACCAAAGATTGTCTCTGGC-3'; and mLdHA reverse, 5'-TTTCCCCCATTAGGTAACGG-3'.

IP and WB

Two alternative IP techniques were used. For the experiments summarized in Figs. 3, 6, and 9, 2×10^7 cells were washed twice with ice-cold PBS, scraped from the dish, and centrifuged at 1,000 g for 10 min. Harvested cells were resuspended in NET-2 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Nonidet P-40) supplemented with protease inhibitor cocktail (EMD Millipore or Roche) and then pulse

sonicated on ice (30 pulses; 0.5 s for each pulse at 40% of maximum energy). The cell lysate was centrifuged at 14,000 *g*, and the supernatant was immunoprecipitated overnight at 4°C with 7.5 µg of goat anti-GFP antibodies prebound to 30 µl of protein G sepharose beads (GE Healthcare). For the IP control, a lysate from parental HeLa cells was used. After five washings with NET-2 buffer, the immunoprecipitated proteins were resuspended in 30 µl of 2× sample buffer.

For the experiments in Figs. S2 and S3, cells were lysed in HNTG buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and protease inhibitors) for 20 min at 4°C. Cell debris were removed by centrifugation (10 min at 9,000 *g*). Protein G sepharose was preincubated with anti-RPAP3 antibody for 2 h (Fig. S3, A and B). For control IPs, empty beads were preincubated with fetal bovine serum and then incubated with the same lysate used for the anti-RPAP3 IPs. For GFP-fusion proteins (Fig. S2 D), GFP-TRAP beads (ChromoTek) were used, and a control was done with HeLa cells that did not express the GFP protein. Beads were incubated with extracts for 1.5 h at 4°C and then were washed five times with HNTG before resuspending in 2× Laemmli buffer.

Subsequently, proteins were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Protran). Membranes were blocked with 5% nonfat milk (weight/volume) in PBST (0.05% Tween-20 in PBS) and incubated with the appropriate primary antibodies diluted in 1% nonfat milk (weight/volume) in PBST followed by incubation with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase. Enzymatic activity was detected using the SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) or ECL kit (Roche). Significance of all experiments was assayed by a two-tailed unpaired *t* test.

SILAC IP and proteomic analysis

SILAC experiments were performed as previously described (Boulon et al., 2010). H9 HeLa cells were grown for 15 d in each isotopically labeled medium to ensure complete incorporation of isotopic amino acids (CIL/Eurisotop). Six 15-cm diameter plates were used per SILAC condition. Cells were rinsed with PBS, trypsinized, and cryogrounded in SILAC buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail). Extracts were incubated for 20 min at 4°C and clarified by centrifugation for 10 min at 20,000 *g*. For all IP experiments, extracts were precleared by incubation with protein G sepharose beads for 1 h at 4°C. The control was extracted from the light condition prepared from HeLa cells that did not express the GFP fusion. Each extract was incubated with 50 µl of GFP-TRAP beads for 75 min at 4°C, washed five times with SILAC buffer, and beads from the different isotopic conditions were finally pooled. Bound proteins were eluted by adding 1% SDS to the beads and boiling for 10 min. Proteomic analysis was performed as previously described (Bizarro et al., 2014).

Yeast two-hybrid assay

Plasmids pACT2 and pAS2DD were introduced into haploid *S. cerevisiae* strains (CG1945 and Y187, respectively). Strains were crossed, and diploids were selected on Leu⁻ Trp⁻ selective media and then plated on triple selective media (Leu⁻ Trp⁻ His⁻). Growth was assessed visually after 3 d at 30°C. The strength of interactions was evaluated by comparing the number of clones growing on Leu⁻ Trp⁻ (selection of diploids) and Leu⁻ Trp⁻ His⁻ plates (selection for interaction).

Luciferase assays

H9 HeLa cells were grown on six-well plates and cotransfected with plasmids expressing a FLAG-tagged FFL in fusion with EFTUD2 and with a plasmid-coding Renilla luciferase (RL) as control. After 48 h,

cells were extracted in 150 µl of passive lysis buffer and incubated at 4°C for 15 min. RL and FFL activities were measured on 96-well plates using 8 µl of cell extract with 50 µl of each solution of the dual-luciferase assay kit (Promega). Values obtained for FFL were normalized to RL values. Experiments were done in triplicate.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the expression of PRPF8 RP mutants, their stability compared with WT, and their effect on splicing. Fig. S2 shows localization of GFP-tagged proteins used in this study and the results of SILAC IP with the GFP-EFTUD2 DADE mutant. Fig. S3 shows interactions of U5-specific proteins with RPAP3 and ZNHIT2 by coimmunoprecipitation and corecruitment assays. Fig. S4 shows the efficiency of siRNAs used in this study. Table S1 is available as an Excel file and is a complete list of proteins coprecipitated in the various SILAC IP experiments.

Acknowledgments

We thank J. Wu, Y. Shav-Tal, I. Poser, D. Drechsler, R. Lüthmann, K. Neugebauer, M. Carmo-Fonseca, and P. Dráber for the reagents. We thank J. Manning for English proofreading.

This work was supported by grants from the Czech Academy of Sciences (RVO68378050), the Czech Science Foundation (P301/12/P425 to Z. Cvačková, 15-00790S to D. Staněk, and 14-34264S to Z. Hořejší), the National Sustainability Program I (LO14119 to D. Staněk), and the Charles University Grant Agency (460413 to A. Malinová). E. Bertrand and C. Verheggen were supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV8-01503) and from the Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labélisée).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: A. Malinová performed all experiments shown in Figs. 1, 2 (A and B), 3, 6 B, 7 B, 8 A, and 9; C. Abéza and C. Verheggen performed all experiments shown in Figs. 4, 5, 6 A, and 7 A and prepared final figures; F. Vandermoere analyzed proteomics data; Z. Cvačková and A. Malinová performed experiments shown in Fig. 2 (C–E) and both participated in figure preparation and manuscript writing; A. Malinová, Z. Cvačková, and D. Matějů prepared the RP mutants of PRPF8 in BAC and stable cell lines; Z. Hořejší provided reagents and protocols for IP of the R2TP complex and participated in manuscript writing; D. Staněk, E. Bertrand, and C. Verheggen supervised the project, designed and analyzed experiments, and wrote the manuscript.

Submitted: 26 January 2017

Revised: 22 March 2017

Accepted: 4 April 2017

References

- Almeida, F., R. Saffrich, W. Ansorge, and M. Carmo-Fonseca. 1998. Microinjection of anti-coilin antibodies affects the structure of coiled bodies. *J. Cell Biol.* 142:899–912. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.142.4.899>
- Bertram, K., D.E. Agafonov, W.-T. Liu, O. Dybkov, C.L. Will, K. Hartmuth, H. Urlaub, B. Kastner, H. Stark, and R. Lüthmann. 2017. Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature.* 542:318–323. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21079>
- Bizarro, J., C. Charron, S. Boulon, B. Westman, B. Pradet-Balade, F. Vandermoere, M.E. Chagot, M. Hallais, Y. Ahmad, H. Leonhardt, et al. 2014. Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J. Cell Biol.* 207:463–480. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201404160>
- Bizarro, J., M. Dodré, A. Huttin, B. Charpentier, F. Schlotter, C. Branlant, C. Verheggen, S. Massenet, and E. Bertrand. 2015. NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly

- of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res.* 43:8973–8989. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv809>
- Boon, K.L., R.J. Grainger, P. Ehsani, J.D. Barrass, T. Auchynnika, C.F. Inglehearn, and J.D. Beggs. 2007. *prp8* mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1077–1083. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1303>
- Boulon, S., N. Marmier-Gourrier, B. Pradet-Balade, L. Wurth, C. Verheggen, B.E. Jádý, B. Rothé, C. Pescia, M.C. Robert, T. Kiss, et al. 2008. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* 180:579–595. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708110>
- Boulon, S., B. Pradet-Balade, C. Verheggen, D. Molle, S. Boireau, M. Georgieva, K. Azzag, M.C. Robert, Y. Ahmad, H. Neel, et al. 2010. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell.* 39:912–924. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.023>
- Boulon, S., E. Bertrand, and B. Pradet-Balade. 2012. HSP90 and the R2TP cochaperone complex: Building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biol.* 9:148–154. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.18494>
- Claudius, A.K., P. Romani, T. Lamkemeyer, M. Jindra, and M. Uhlřřová. 2014. Unexpected role of the steroid-deficiency protein ecdysoneless in pre-mRNA splicing. *PLoS Genet.* 10:e1004287. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004287>
- Cloutier, P., and B. Coulombe. 2010. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol.* 88:211–221. <http://dx.doi.org/10.1139/O09-173>
- Cvačková, Z., D. Matějů, and D. Staněk. 2014. Retinitis pigmentosa mutations of *SNRNP200* enhance cryptic splice-site recognition. *Hum. Mutat.* 35:308–317. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22481>
- Darzacq, X., N. Kittur, S. Roy, Y. Shav-Tal, R.H. Singer, and U.T. Meier. 2006. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J. Cell Biol.* 173:207–218. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200601105>
- Dibble, C.C., and L.C. Cantley. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* 25:545–555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.002>
- Forget, D., A.A. Lacombe, P. Cloutier, R. Al-Khoury, A. Bouchard, M. Lavallée-Adam, D. Faubert, C. Jeronimo, M. Blanchette, and B. Coulombe. 2010. The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPA4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Proteomics.* 9:2827–2839. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.003616>
- Gonzalez-Santos, J.M., H. Cao, R.C. Duan, and J. Hu. 2008. Mutation in the splicing factor Hprp3p linked to retinitis pigmentosa impairs interactions within the U4/U6 snRNP complex. *Hum. Mol. Genet.* 17:225–239. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddm300>
- Gottschalk, A., B. Kastner, R. Lührmann, and P. Fabrizio. 2001. The yeast U5 snRNP coisolated with the U1 snRNP has an unexpected protein composition and includes the splicing factor Aar2p. *RNA.* 7:1554–1565.
- Hartong, D.T., E.L. Berson, and T.P. Dryja. 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 368:1795–1809. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69740-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69740-7)
- Hořejší, Z., H. Takai, C.A. Adelman, S.J. Collis, H. Flynn, S. Maslen, J.M. Skehel, T. de Lange, and S.J. Boulton. 2010. CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell.* 39:839–850. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.037>
- Hořejší, Z., L. Stach, T.G. Flower, D. Joshi, H. Flynn, J.M. Skehel, N.J. O'Reilly, R.W. Ogrodowicz, S.J. Smerdon, and S.J. Boulton. 2014. Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell Reports.* 7:19–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.013>
- Hornbeck, P.V., B. Zhang, B. Murray, J.M. Kornhauser, V. Latham, and E. Skrzypek. 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 43(D1):D512–D520. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku1267>
- Huranová, M., J. Hnilicová, B. Fleischer, Z. Cvačková, and D. Staněk. 2009. A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Hum. Mol. Genet.* 18:2014–2023. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp125>
- Islam, M.P., and E.S. Roach. 2015. Tuberous sclerosis complex. *Handb. Clin. Neurol.* 132:97–109. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00006-8>
- Kamano, Y., M. Saeki, H. Egusa, Y. Kakhara, W.A. Houry, H. Yatani, and Y. Kamisaki. 2013. PIH1D1 interacts with mTOR complex 1 and enhances ribosome RNA transcription. *FEBS Lett.* 587:3303–3308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.001>
- Kondo, H., T. Tahira, A. Mizota, E. Adachi-Usami, K. Oshima, and K. Hayashi. 2003. Diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa by linkage-based exclusion screening with multiple locus-specific microsatellite markers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:1275–1281. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.02-0895>
- Kuhn, A.N., Z. Li, and D.A. Brow. 1999. Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol. Cell.* 3:65–75. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80175-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80175-6)
- Linder, B., A. Hirmer, A. Gal, K. Rütter, H.J. Bolz, C. Winkler, B. Lagerbauer, and U. Fischer. 2014. Identification of a PRPF4 loss-of-function variant that abrogates U4/U6.U5 tri-snRNP integration and is associated with retinitis pigmentosa. *PLoS One.* 9:e111754. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111754>
- Machado-Pinilla, R., D. Liger, N. Leulliot, and U.T. Meier. 2012. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA.* 18:1833–1845. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.034942.112>
- Maeder, C., A.K. Kutach, and C. Guthrie. 2009. ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:42–48. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1535>
- Makarov, E.M., O.V. Makarova, H. Urlaub, M. Gentzel, C.L. Will, M. Wilm, and R. Lührmann. 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science.* 298:2205–2208. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1077783>
- Martínez-Gimeno, M., M.J. Gamundi, I. Hernan, M. Maseras, E. Millá, C. Ayuso, B. García-Sandoval, M. Beneyto, C. Vilela, M. Baiget, et al. 2003. Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes *PRPF3*, *PRPF8*, and *PRPF31* in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:2171–2177. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.02-0871>
- Matera, A.G., and Z. Wang. 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:108–121. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3742>
- McKeegan, K.S., C.M. Debieux, S. Boulon, E. Bertrand, and N.J. Watkins. 2007. A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol. Cell. Biol.* 27:6782–6793. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01097-07>
- McKie, A.B., J.C. McHale, T.J. Keen, E.E. Tarttelin, R. Goliath, J.J. van Lith-Verhoeven, J. Greenberg, R.S. Ramesar, C.B. Hoyng, F.P. Cremers, et al. 2001. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene *PRPF8* in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum. Mol. Genet.* 10:1555–1562. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.15.1555>
- Mir, R.A., A. Bele, S. Mirza, S. Srivastava, A.A. Olou, S.A. Ammons, J.H. Kim, C.B. Gurumurthy, F. Qiu, H. Band, and V. Band. 2015. A novel interaction of ecdysoneless (ECD) protein with R2TP complex component RUVBL1 is required for the functional role of ECD in cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 36:886–899. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00594-15>
- Mordes, D., X. Luo, A. Kar, D. Kuo, L. Xu, K. Fushimi, G. Yu, P. Sternberg Jr., and J.Y. Wu. 2006. Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol. Vis.* 12:1259–1271.
- Mordes, D., L. Yuan, L. Xu, M. Kawada, R.S. Molday, and J.Y. Wu. 2007. Identification of photoreceptor genes affected by PRPF31 mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neurobiol. Dis.* 26:291–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.026>
- Mozaffari-Jovin, S., K.F. Santos, H.H. Hsiao, C.L. Will, H. Urlaub, M.C. Wahl, and R. Lührmann. 2012. The Prp8 RNase H-like domain inhibits Brr2-mediated U4/U6 snRNA unwinding by blocking Brr2 loading onto the U4 snRNA. *Genes Dev.* 26:2422–2434. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.200949.112>
- Mozaffari-Jovin, S., T. Wandersleben, K.F. Santos, C.L. Will, R. Lührmann, and M.C. Wahl. 2013. Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8. *Science.* 341:80–84. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1237515>
- Mozaffari-Jovin, S., T. Wandersleben, K.F. Santos, C.L. Will, R. Lührmann, and M.C. Wahl. 2014. Novel regulatory principles of the spliceosomal Brr2 RNA helicase and links to retinal disease in humans. *RNA Biol.* 11:298–312. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.28353>
- Nguyen, T.H.D., J. Li, W.P. Galej, H. Oshikane, A.J. Newman, and K. Nagai. 2013. Structural basis of Brr2-Prp8 interactions and implications for U5 snRNP biogenesis and the spliceosome active site. *Structure.* 21:910–919. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.04.017>
- Novotný, I., A. Malinová, E. Stejskalová, D. Matějů, K. Klimešová, A. Roithová, M. Švéda, Z. Knejzlík, and D. Staněk. 2015. SART3-dependent accumulation of incomplete spliceosomal snRNPs in Cajal bodies. *Cell Reports.* 10:429–440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.030>
- Ong, S.E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 1:376–386. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200>

- Pal, M., M. Morgan, S.E.L. Phelps, S.M. Roe, S. Parry-Morris, J.A. Downs, S. Polier, L.H. Pearl, and C. Prodromou. 2014. Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure*. 22:805–818. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2014.04.001>
- Pena, V., S. Liu, J.M. Bujnicki, R. Lührmann, and M.C. Wahl. 2007. Structure of a multipartite protein-protein interaction domain in splicing factor prp8 and its link to *retinitis pigmentosa*. *Mol. Cell*. 25:615–624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.023>
- Poser, I., M. Sarov, J.R. Hutchins, J.K. Hériché, Y. Toyoda, A. Pozniakovsky, D. Weigl, A. Nitzsche, B. Hegemann, A.W. Bird, et al. 2008. BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. *Nat. Methods*. 5:409–415. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1199>
- Raimer, A.C., K.M. Gray, and A.G. Matera. 2016. SMN - A chaperone for nuclear RNP social occasions? *RNA Biol*. 20:1–11. <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1236168>
- Růžičková, Š., and D. Staněk. 2016. Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol*. 14:1–9. <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1191735>
- Sleeman, J.E., and A.I. Lamond. 1999. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol*. 9:1065–1074. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80475-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80475-8)
- Small, E.C., S.R. Leggett, A.A. Winans, and J.P. Staley. 2006. The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DExD/H box ATPase. *Mol. Cell*. 23:389–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.043>
- Staněk, D. 2016. Cajal body and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol*. 14:1–9. <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2016.1231359>
- Staněk, D., J. Pridalová-Hnilicová, I. Novotný, M. Huranová, M. Blazíková, X. Wen, A.K. Sapra, and K.M. Neugebauer. 2008. Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell*. 19:2534–2543. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1259>
- Tanackovic, G., A. Ransijn, P. Thibault, S. Abou Elela, R. Klinck, E.L. Berson, B. Chabot, and C. Rivolta. 2011. *PRPF* mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet*. 20:2116–2130. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr094>
- Towns, K.V., A. Kipioti, V. Long, M. McKibbin, C. Maubaret, V. Vaclavik, P. Ehsani, K. Springell, M. Kamal, R.S. Ramesar, et al. 2010. Prognosis for splicing factor PRPF8 retinitis pigmentosa, novel mutations and correlation between human and yeast phenotypes. *Hum. Mutat*. 31:E1361–E1376. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21236>
- Trinkle-Mulcahy, L., S. Boulon, Y.W. Lam, R. Urcia, F.M. Boisvert, F. Vandermoere, N.A. Morrice, S. Swift, U. Rothbauer, H. Leonhardt, and A. Lamond. 2008. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol*. 183:223–239. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200805092>
- Verheggen, C., B. Pradet-Balade, and E. Bertrand. 2015. SnoRNPs, ZNHIT proteins and the R2TP pathway. *Oncotarget*. 6:41399–41400.
- Weber, G., V.F. Cristão, F. de L. Alves, K.F. Santos, N. Holton, J. Rappsilber, J.D. Beggs, and M.C. Wahl. 2011. Mechanism for Aar2p function as a U5 snRNP assembly factor. *Genes Dev*. 25:1601–1612. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.635911>
- Weber, G., V.F. Cristão, K.F. Santos, S.M. Jovin, A.C. Heroven, N. Holton, R. Lührmann, J.D. Beggs, and M.C. Wahl. 2013. Structural basis for dual roles of Aar2p in U5 snRNP assembly. *Genes Dev*. 27:525–540. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.213207.113>
- Whitesell, L., E.G. Mimmaugh, B. De Costa, C.E. Myers, and L.M. Neckers. 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:8324–8328. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.18.8324>
- Yan, C., J. Hang, R. Wan, M. Huang, C.C.L. Wong, and Y. Shi. 2015. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science*. 349:1182–1191. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aac7629>
- Yuan, L., M. Kawada, N. Havlioglu, H. Tang, and J.Y. Wu. 2005. Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J. Neurosci*. 25:748–757. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2399-04.2005>
- Zhao, R., Y. Kakiyama, A. Gribun, J. Huen, G. Yang, M. Khanna, M. Costanzo, R.L. Brost, C. Boone, T.R. Hughes, et al. 2008. Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol*. 180:563–578. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200709061>
- Ziviello, C., F. Simonelli, F. Testa, M. Anastasi, S.B. Marzoli, B. Falsini, D. Ghigliione, C. Macaluso, M.P. Manitto, C. Garrè, et al. 2005. Molecular genetics of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): a comprehensive study of 43 Italian families. *J. Med. Genet*. 42:e47. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.031682>

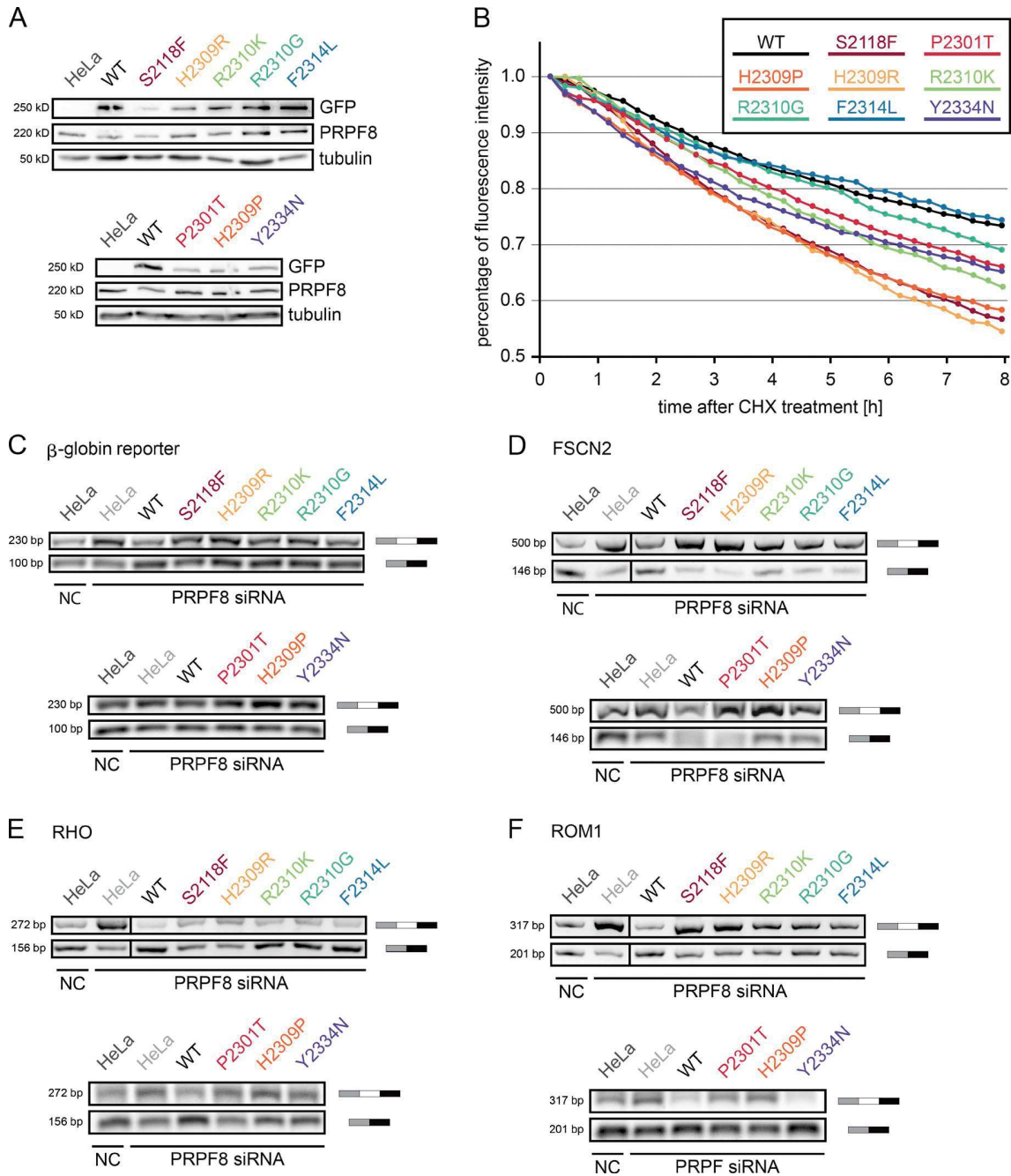


Figure S1. **Expression and stability of PRPF8 RP mutants, and their effect on splicing.** (A) Images represent WBs made with extracts of cells expressing the indicated PRPF8-LAP and showing the expression of endogenous PRPF8 (anti-PRPF8 antibody line) and LAP-tagged PRPF8 expressed from BACs (anti-GFP antibody line). Tubulin was used as a loading control. (B) Measurements of protein degradation rates. The amount of proteins was determined using time-lapse microscopy after inhibition of protein synthesis with cycloheximide (CHX). GFP fluorescence intensity was measured in 15-min intervals for 8 h. Each line represents a mean of three experiments (six for WT), and in each experiment, 8–10 cells were analyzed. (C–F) RT-PCR gels of the β -globin gene reporter (C) and the retina-specific reporter genes FSCN2 (D), RHO (E), and ROM1 (F) in cells knocked down for endogenous PRPF8 and expressing the indicated LAP-tagged PRPF8 variants. The upper bands represent unspliced variants, and the lower bands represent spliced variants. Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out.

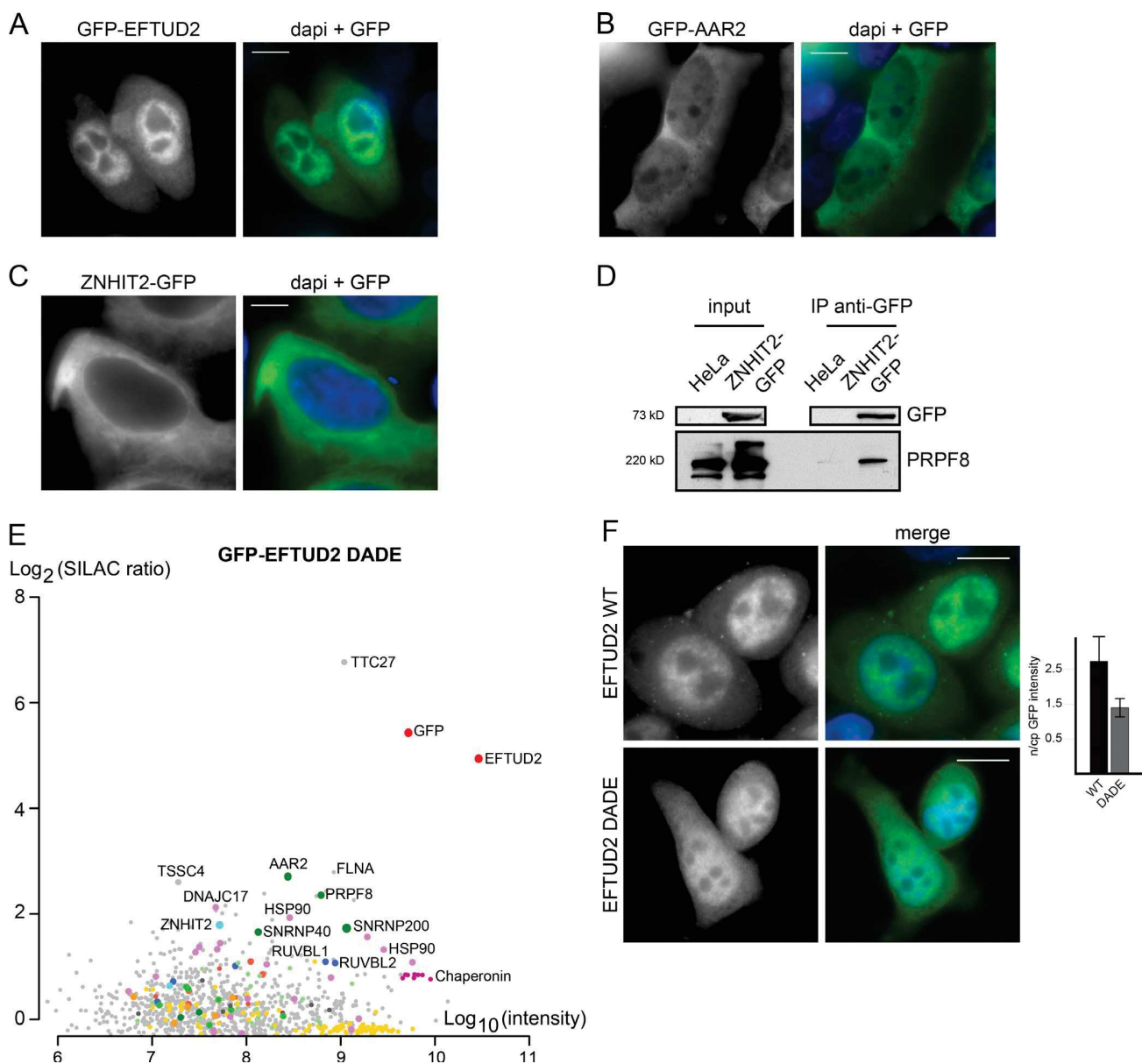


Figure S2. **Localization of ZNHIT2-GFP, GFP-EFTUD2 WT/DADE mutant, and GFP-AAR2, interaction of PRPF8 with ZNHIT2-GFP, and proteomic analysis of GFP-EFTUD2 DADE mutant.** (A–C) HeLa cells stably expressing the indicated fusion proteins. (D) Interaction between PRPF8 and GFP-ZNHIT2. WBs made with extracts of parental HeLa cells (HeLa) or HeLa cells transiently expressing GFP-ZNHIT2 (GFP-ZNHIT2; input), and immunoprecipitated with anti-GFP antibody (IP anti-GFP). Inputs contain 5% of the materials in the IP. Antibodies used to probe the WBs are indicated on the right. (E) Proteomic analyses of the EFTUD2 DADE mutant interactome. The graph displays SILAC ratios (y axis) as functions of signal abundance (x axis) measured by quantitative proteomic analysis of extracts from the HeLa cell-expressing GFP-EFTUD2 DADE mutant and immunoprecipitated with anti-GFP antibody. SILAC ratios are calculated from a control IP done with parental HeLa cells. Significance values are given in Table S1. (F) Microscopy images of HeLa cells stably expressing GFP-EFTUD2-WT or DADE mutant. Quantification of the GFP signals is shown on the left, expressed as ratios of green versus red (after background subtraction) intensities. Values are means calculated from >30 cells, and the error bars indicate SD. Green, GFP; blue, DAPI. Bars, 10 μ m. n/cp, nucleocytoplasmic.

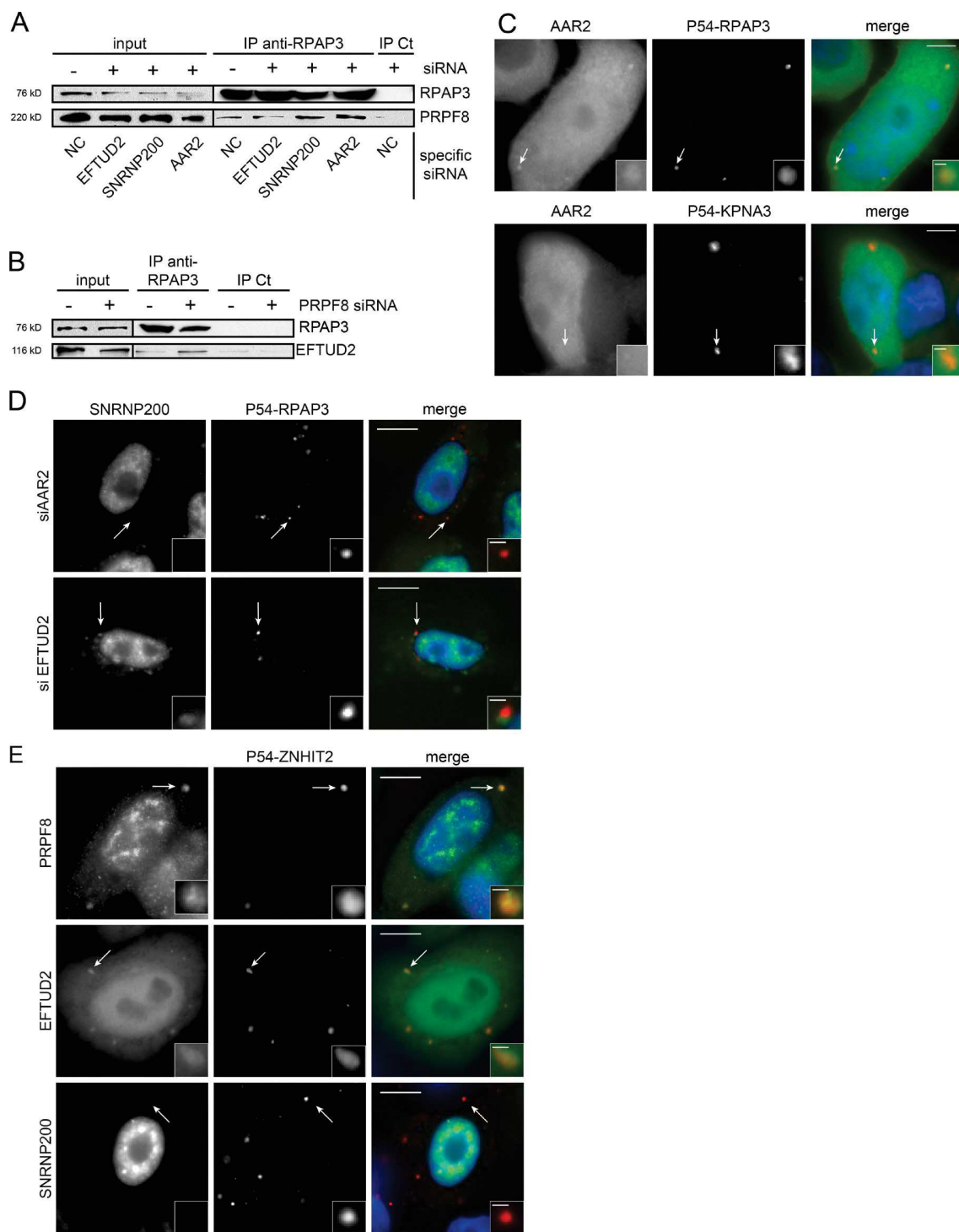


Figure S3. **Interaction of RPAP3 and ZNHIT2 with PRPF8, EFTUD2, AAR2, and SNRNP200.** (A) Interaction between RPAP3 and PRPF8 in the presence and absence of other U5 proteins and AAR2. Images represent WBs made with extracts of HeLa cells treated with the indicated siRNAs and immunoprecipitated with anti-RPAP3 antibody (IP anti-RPAP3) or IgG as control (Ct; IP Ct). Inputs contain 5% of the materials in the IP. Antibodies used to probe the WBs are indicated on the right. (B) Interaction between RPAP3 and EFTUD2 in the presence and absence of PRPF8. Legend is as in A. Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (C) Analysis of the interaction between AAR2 and RPAP3 with a cytoplasmic corecruitment assay. Top rows are microscopy images of HeLa cells stably expressing a p54-DsRed2-RPAP3 fusion and transiently transfected with a plasmid expressing GFP-AAR2. Bottom rows are images of HeLa cells expressing p54-DsRed2-KPNA3 instead of p54-DsRed2-RPAP3 as a control. (D) Analysis of the interaction between SNRNP200 and RPAP3 with a cytoplasmic corecruitment assay. Microscopy images of HeLa cells stably expressing a p54-DsRed2-RPAP3 fusion and transiently transfected with both a plasmid expressing GFP-SNRNP200 and siRNAs against AAR2 (top) or EFTUD2 (bottom). Legend is as in C. (E) Analysis of the interaction between ZNHIT2 and PRPF8, EFTUD2, and SNRNP200 with a cytoplasmic corecruitment assay. Microscopy images of HeLa cells transiently expressing a p54-DsRed2-ZNHIT2 fusion and a plasmid expressing GFP-SNRNP200 (bottom). PRPF8 and EFTUD2 were detected by indirect IF (top and middle, respectively). Legend is as in C. Insets are magnifications of the dots indicated by arrows. Bars: (main images) 10 μ m; (insets) 1 μ m.

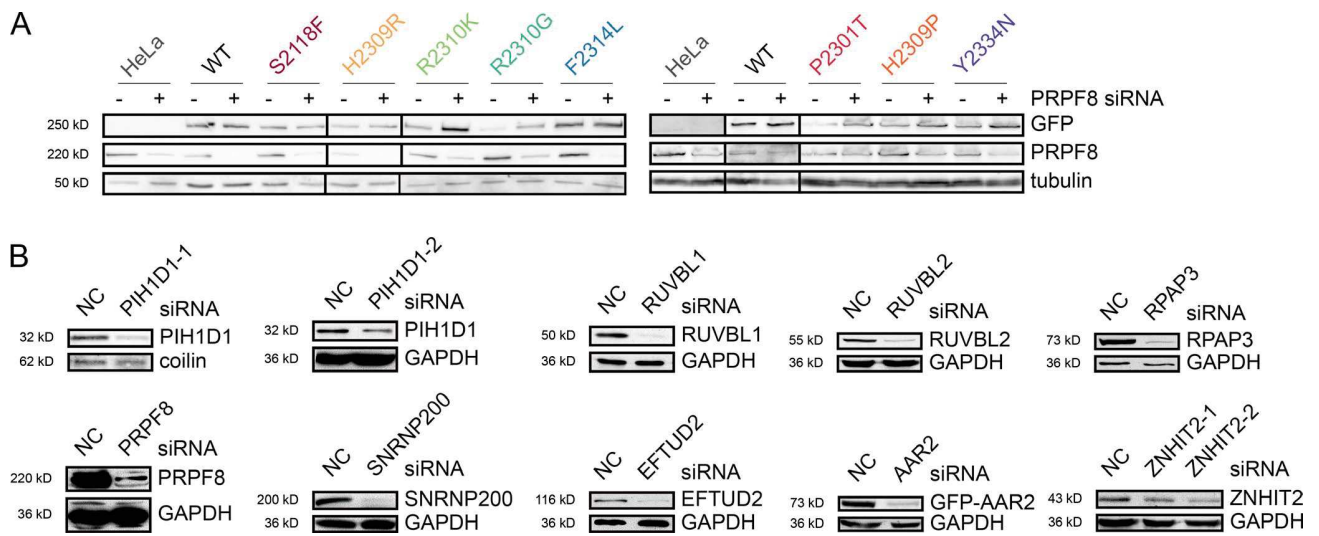


Figure S4. **KD efficiency of siRNAs.** (A) KD of endogenous PRPF8. WBs were made from extracts of cells expressing the PRPF8-LAP variants indicated at the top and treated with the siRNA targeting endogenous PRPF8 ("+") or an NC siRNA ("-"). Antibodies used to probe the WBs are indicated at the right. The PRPF8 bands correspond to the endogenous protein. Tubulin was used as the loading control. Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (B) KD efficiency of individual siRNAs used in this work was measured by WBs made with extracts of cells treated with an NC siRNA and an siRNA targeting the indicated protein. Coilin or GAPDH were used as loading controls.

Table S1 is a separate Excel file showing a hit list of the proteomic experiments.

ARTICLE 3 : The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones

Chloé Maurizy^{1,2}, Marc Quinternet³, Yoann Abel^{1,2}, Céline Verheggen^{1,2}, Paulo E. Santo^{4,5}, Maxime Bourguet⁶, Ana C.F. Paiva^{4,5}, Benoît Bragantini⁷, Marie-Eve Chagot⁷, Marie-Cécile Robert^{1,2}, Claire Abeza^{1,2}, Philippe Fabre⁷, Philippe Fort⁸, Franck Vandermoere⁹, Pedro M.F. Sousa^{4,5}, Jean-Christophe Rain¹⁰, Bruno Charpentier⁷, Sarah Cianférani⁶, Tiago M. Bandejas^{4,5}, Bérengère Pradet-Balade⁸, Xavier Manival⁷ & Edouard Bertrand^{1,2}

¹ IGMM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier 34293, France.

² Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer, 34293 Montpellier, France.

³ CNRS, INSERM, IBSLOR, Université de Lorraine, Nancy F-54000, France.

⁴ iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras 2781- 901, Portugal.

⁵ Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Oeiras 2780-157, Portugal.

⁶ Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Strasbourg 67000, France.

⁷ CNRS, IMoPA, Université de Lorraine, Nancy F-54000, France.

⁸ CRBM, University of Montpellier, CNRS, 1919 Route de Mende, Montpellier 34090, France.

⁹ IGF, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier 34090, France.

¹⁰ Hybrigenics Services, Paris 75014, France.

Résumé

Le R2TP est un co-chaperon de HSP90 qui assemble d'importantes machineries macromoléculaires mais la manière dont il reconnaît ses substrats reste peu étudiée. Quelques études montrent le rôle de PIH1D1 mais RPAP3 pouvait aussi jouer un rôle. Le domaine C-terminal de RPAP3 (RPAP3_CTER, acides aminés 546 à 665) est spécifique aux eucaryotes supérieurs et il intervient pour l'interaction avec les RUVBL. Nous avons souhaité étudier son rôle et sa structure. En faisant une analyse protéomique après IP SILAC de RPAP3-CTER, nous identifions fortement les RUVBL, mais aussi des clients du R2TP, des co-facteurs des RUVBL, les autres sous-unités du PAQosome, ainsi que des isoformes de HSP70 avec son régulateur BAG2 (Figure 2A). Nous souhaitons mieux caractériser l'interaction de ce domaine avec les RUVBL. Seule l'interaction entre RPAP3-CTER et RUVBL2 a été confirmée par double hybride. Une co-expression *in vitro* chez *E. coli* réalisée par nos collaborateurs à Nancy a montré que RPAP3-CTER s'associait avec RUVBL1 et RUVBL2. L'analyse de ce complexe a révélé que les RUVBL étaient sous une forme hétéro-hexamérique. Cette interaction est directe et ne requiert pas d'ATP car des mutants des RUVBL ne liant plus l'ATP sont toujours capables d'interagir avec RPAP3 (Figure Supplémentaire 2). En revanche, une mutation empêchant l'hydrolyse de l'ATP (E en Q dans le domaine de Walker

B) réduit l'interaction avec RPAP3-CTER. Grâce à l'analyse structurale du complexe, nous avons pu générer deux mutants de RPAP3_CTER (mut1: R623A-M626A; mut2 : F630A-S632A) que nous avons étudié en protéomique après IP SILAC. Ils perdent l'interaction avec les RUVBL mais aussi avec certains clients. La perte d'interaction avec les RUVBL a été validée en double hybride et en IP LUMIER. Ces données suggèrent donc que RUVBL1 et RUVBL2 sont nécessaires à l'interaction de RPAP3 avec ces clients du R2TP.

Le domaine CTER de RPAP3 est conservé dans d'autres protéines chez l'homme et notamment SPAG1, très homologue à RPAP3. De même, PIH1D1 présente des homologues appelés PIH1D2, PIH1D3 et DNAAF2 (aussi connu sous le nom de Kitoun). Nous avons cherché à identifier si ces protéines forment des complexes R2TP-like qui seraient constitués de RPAP3-like/PIH-like en association avec les RUVBL1/RUVBL2. DNAAF2 s'associe avec DYX1C1, une protéine contenant des domaines CS similaire à celui de PIH1D1 et un domaine TRP semblable à celui de RPAP3 (Figure 4A). Nous avons étudié les interactions entre toutes ces protéines en protéomique quantitative et en IP LUMIER. Trois types de complexes comparables au R2TP ont ainsi pu être identifiés (Figure 5C) et la composition de ces derniers a pu être corroborée dans un arbre phylogénétique (Figure 1). RPAP3 présente aussi une isoforme qui ne peut pas lier PIH1D1 du fait d'un épissage alternatif. Cette isoforme 2 est en association avec RUVBL1 et RUVBL2. Ce complexe est identique au R2TP canonique sauf qu'il manque PIH1D1, et a donc été nommé R2T. Un deuxième complexe comprend SPAG1, PIH1D2 et RUVBL1/2. Ce complexe partage une organisation semblable au R2TP canonique et a été nommé R2SP. Un dernier complexe contiendrait SPAG1, DNAAF2 et RUVBL1/2 soit un complexe R2SD mais ce complexe reste hypothétique puisqu'il n'a été détecté que dans les IP LUMIER mais pas en protéomique. On observe également un hétéro-dimère entre DYX1C1-iso-a et DNAAF2 et DYX1C1-iso-c et PIH1D3. Ces interactions avaient déjà été rapportées (*Takar, 2013 ; Olcese, 2017*) sans que la distinction entre les deux isoformes soit faites.

Nous avons ensuite cherché à identifier la fonction de ces différentes formes de R2TP et si elles étaient spécifiques d'un compartiment cellulaire ou d'un type cellulaire. Toutes les protéines ont donc été fusionnées à une GFP, nous permettant ainsi de voir qu'elles étaient localisées à différents endroits de la cellule, suggérant des fonctions spécifiques (Figure Supplémentaire 5). DYX1C1-iso-c et son partenaire PIH1D3 se concentrent dans le noyau dans des structures rondes. L'épissage alternatif de RPAP3 détermine également la localisation des protéines : l'isoforme 1 est cytoplasmique alors que l'isoforme 2 est nucléaire. RUVBL1, RPAP3 et PIH1D1 sont exprimés de manière similaire dans toutes les lignées cellulaires (Figure Supplémentaire 6). DNAAF2 et SPAG1 sont également exprimés dans toutes les cellules mais avec un faible enrichissement au niveau du tissu testiculaire. PIH1D2, PIH1D3 et RUVBL2 sont quand à eux très exprimés dans le tissu

testiculaires suggérant un rôle important dans cet organe. Nous avons ensuite testé l'activité chaperon du R2SP. Un crible double-hybride de PIH1D2 a permis d'identifier des clients potentiels du complexe R2SP et nombreuses de ces protéines ont une expression tissu spécifique au niveau des testicules (Figure 6). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'expression de GFP-PIH1D2 dans des cellules HeLa augmentait l'expression de ces clients du R2SP avec un effet majoré à une température correspondant à celle des testicules (32°C). La liprine- α 2 (PPFIA2) est un partenaire fort de PIH1D2. Les liprines sont d'importantes molécules d'échafaudage rassemblant divers facteurs pour contrôler l'adhérence cellulaire, la migration cellulaire ou encore l'organisation des synapses (*Stryker and Johnson, 2007*). Par IP LUMIER, nous avons montré que PIH1D2 favorise l'interaction de la liprine- α 2 avec ses partenaires. PIH1D2 s'associe directement avec la liprine- α 2 alors que SPAG1 interagit avec les partenaires de la liprine- α 2. Cela suggère un modèle dans lequel les protéines s'associent en complexe en passant par le R2SP qui va leur permettre de se rapprocher et d'interagir. L'activité chaperon des RUVBL va ensuite permettre l'assemblage du complexe fonctionnel. Le recrutement indépendant de plusieurs sous-unités des complexes clients peut constituer un mécanisme d'action général pour cette classe de chaperons.

Contribution personnelle

Analyse protéomique en SILAC de GFP-RPAP3-CTER

Pour mieux comprendre la fonction du domaine CTER de RPAP3, j'ai procédé à l'analyse protéomique quantitative de ces partenaires après IP SILAC. J'ai fusionné ce domaine à la protéine GFP et l'ai exprimé de façon stable dans des cellules HeLa. Les cellules ont été maintenues quinze jours en culture dans des milieux pauvre (R0K0, cellules contrôles n'exprimant pas de GFP) ou riche en acide aminées marqués (R4K6, cellules exprimant stablement GFP-RPAP3-CTER). Les extraits de cellules ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-GFP et les culots ont été soumis à une analyse par spectrométrie de masse à la plateforme de protéomique de Montpellier en collaboration avec Franck Vandermoere (Figure 2A). RUVBL1 et RUVBL2 ont été trouvés fortement enrichis avec RPAP3_CTER. Une préfoldine PFDN2 et des sous-unités de HSP90 et 70 ont également été identifiées ainsi que des clients connus du R2TP comme SHQ1 et NOP58 (snoRNP en jaune), PRPF8, EFTUD2 et SNRNP200 (snRNP U5 en vert) et POLR2A (ARN Pol II en orange). Des co-facteurs des RUVBL ont aussi été immunoprécipités comme ZNHIT2, c2orf44, c12orf45 (renommé NOPCHAP1) et DPCD (en bleu clair). Ces données suggèrent que RPAP3_CTER participe à l'interaction entre les RUVBL et certains clients du R2TP.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-04431-1

OPEN

The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones

Chloé Maurizy^{1,2}, Marc Quinternet³, Yoann Abel^{1,2}, Céline Verheggen^{1,2}, Paulo E. Santo^{4,5}, Maxime Bourguet⁶, Ana C.F. Paiva^{4,5}, Benoît Bragantini⁷, Marie-Eve Chagot⁷, Marie-Cécile Robert^{1,2}, Claire Abeza^{1,2}, Philippe Fabre⁷, Philippe Fort⁸, Franck Vandermoere⁹, Pedro M.F. Sousa^{4,5}, Jean-Christophe Rain¹⁰, Bruno Charpentier⁷, Sarah Cianférani⁶, Tiago M. Bandejas^{4,5}, Bérengère Pradet-Balade⁸, Xavier Manival⁷ & Edouard Bertrand^{1,2}

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

¹IGMM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier 34293, France. ²Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer, 34293 Montpellier, France. ³CNRS, INSERM, IBSLOR, Université de Lorraine, Nancy F-54000, France. ⁴iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras 2781-901, Portugal. ⁵Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Oeiras 2780-157, Portugal. ⁶Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Strasbourg 67000, France. ⁷CNRS, IMoPA, Université de Lorraine, Nancy F-54000, France. ⁸CRBM, University of Montpellier, CNRS, 1919 Route de Mende, Montpellier 34090, France. ⁹IGF, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier 34090, France. ¹⁰Hybrigenics Services, Paris 75014, France. These authors contributed equally: Chloé Maurizy, Marc Quinternet. Correspondence and requests for materials should be addressed to X.M. (email: xavier.manival@univ-lorraine.fr) or to E.B. (email: edouard.bertrand@igmm.cnrs.fr)

The R2TP complex was discovered in *S. cerevisiae* as an HSP90 co-factor¹. R2TP is an unusual co-chaperone because it appears specialized in quaternary protein folding, and in particular in the assembly of key cellular machineries important for cell growth². Important R2TP clients are the small nucleolar ribonucleoprotein particles (snoRNPs), which are required for ribosomal RNAs maturation³. More recently, other substrates were described, including the U4 and U5 spliceosomal snRNAs^{4–6}, the nuclear RNA polymerases^{7–9}, and the family of PI3K-like kinases (PIKKs), which comprises mTOR, DNA-PK, ATR, ATM, SMG1 and TRRAP^{10,11}. Given the role of these clients in cell growth and proliferation, it was hypothesized that R2TP mediates some of the tumorigenic effects elicited by HSP90¹². Newly identified clients involved in DNA damage response corroborate this possibility¹³.

In humans, R2TP is composed of a core that associates with prefoldins and additional factors to form the R2TP/Prefoldin-like complex, recently renamed PAQosome^{2,7–9}. The R2TP core is composed of four subunits (Fig. 1a): PIH1D1, RPAP3, and the two related AAA+ATPases RUVBL1 and RUVBL2 (also called Pontin and Reptin). RPAP3 directly binds HSP90 and forms a stable heterodimer with PIH1D1^{14,15}. These components are believed to function as adapter and regulatory factors, while RUVBL1 and RUVBL2 are catalytic components that likely possess a chaperone activity¹⁶. The analysis of snoRNP biogenesis suggests that R2TP functions through a stepwise process, where HSP90 stabilizes clients before their assembly, followed by the independent recruitment of several snoRNP components by R2TP, and ending in the loading of RUVBL1/2 on the client complex¹⁷. The molecular role of RUVBL1 and RUVBL2 still remains elusive. Structural studies showed that they form hexameric rings typical for this class of enzymes¹⁸. In addition, they contain an insertion called domain II, which protrudes from the ATPase ring and forms a flexible structure whose conformation depends on the presence and nature of bound nucleotides^{19,20}. RUVBL1/2 make ATP-dependent contacts with some cofactors and client proteins^{21,22}, suggesting that ATP loading and hydrolysis may act as a switch to control the binding and release of clients. Accordingly, it has been proposed that RUVBL1/2 stabilize interactions between subunits of target complexes¹⁷, or, alternatively, that they stimulate the dissociation of specific assembly factors²³. Recent structural analyses showed that RUVBL1/2 cycle between hexameric and dodecameric forms, with client binding promoting dimerization of the hexamer, and ATP hydrolysis dissociation of the dodecamer¹⁶. This provides a glimpse of how these enzymes may chaperone their clients.

Structural studies revealed that PIH1D1 has two domains. Its N-terminal region harbors the conserved PIH domain that possesses a phospho-peptide binding pocket responsible for recognizing some substrates^{14,15}. Its C-terminal region folds as a CS domain and mediates hetero-dimerization with RPAP3^{14,15,24}. RPAP3 has a C-terminal domain of unknown function (RPAP3-Cter), and a middle region composed of six tetratricopeptide repeats (TPR) arranged in two consecutive domains (Fig. 1b). Structural studies showed that they bind HSP90 through five conserved residues forming a carboxylate clamp, which catches the last C-terminal residues of the chaperone (-MEEVD^{15,25}). A recent cryo-EM structure of the yeast R2TP revealed that a single copy of the Tap1p:PiH1p dimer binds an hetero-hexamer of Rvb1/2 (the yeast homologs of RPAP3, PIH1D1 and RUVBL1/2, respectively^{26,27}). This interaction involves the DII domain of the ATPases and the linker separating the PIH and CS domains of PiH1p^{26–28}.

In this study, we elucidate the 3D structure of the RPAP3 C-terminal domain and we show that it binds directly the RUVBL1/2 ATPases. A similar domain is also present in a human protein

called SPAG1, and we demonstrate that it forms an R2TP-like complex that functions in quaternary protein folding.

Results

The RPAP3 C-ter domain co-evolved with PIH-domain proteins. Although extensive structural studies have been performed with R2TP proteins², the structure and function of RPAP3-Cter is unknown. This domain is absent in the *S. cerevisiae* homolog of RPAP3, and we thus performed an evolutionary analysis (Fig. 1c). Besides RPAP3, the human genome encodes two proteins harboring a RPAP3-Cter domain: SPAG1, which contains three TPR domains, and CCDC103, which has a N-terminal dynein attachment domain. Proteins with both an RPAP3-Cter and a TPR domain occur in all eukaryotic lineages (Fig. 1c; blue dots in the RPAP3_C column). A single such protein was likely present at the root of Eukaryotes, and a duplication event having occurred between Amoebozoa and Opisthokonta (Fungi and Metazoa) generated RPAP3 and SPAG1. The human genome encodes four proteins with PIH domains: PIH1D1-3 and DNAAF2 (also known as Kintoun). DNAAF2 associates with DYX1C1²⁹, a CS- and TPR- containing protein that we included in our analysis. Most eukaryotic lineages encode three PIH-proteins and one DYX1C1 ortholog. These proteins are thus of ancient origin, as previously noted³⁰. Interestingly, the duplication of the RPAP3 ancestor is mimicked by a similar contemporary duplication of the ancestor of PIH1D1, which generated PIH1D1 and PIH1D2. Note that neither RUVBL1/2 nor other HSP90 co-chaperone were duplicated (Fig. 1c). Altogether, this analysis indicates that the ancestral form of RPAP3 had both TPR and RPAP3-Cter domains, suggesting an important function for this domain. This protein further co-evolved with the ancestor of PIH1D1, pointing to a link with R2TP.

The NMR structure of RPAP3-Cter reveals a helical 3D fold.

To get more information on RPAP3-Cter, we performed structural studies. We expressed fragments 535–665 and 547–665 of human RPAP3. Only the largest domain, i.e., RPAP3_{535–665}, was soluble after expression and purification from *E. coli* (Supplementary Fig. 1A, B). Using NMR, the intensity and distribution of peaks in the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum revealed a properly folded domain (Supplementary Fig. 1C). We obtained a well-resolved set of 20 water-refined structures (Table 1), revealing that this domain is composed of 8 α -helices that pack together to form a globular object (Fig. 1d–f). Interestingly, the residues 541–548 form a loop that protects several hydrophobic amino-acids from solvent, including Leu542, Pro543, Ile545, and Pro546 (Supplementary Fig. 1D). This loop contributes to the solubility of RPAP3-Cter since its truncation in RPAP3_{547–665} leads to protein aggregation. We submitted our structure to the DALI server to search for potential structural homologs. No strong candidate could be identified using a top DALI Z-score below 8, with a mean RMSD and identity percentage of 3.6 Å and 9.7%, respectively. We concluded that RPAP3-Cter adopts a 3D fold, linked to an uncharacterized biological function.

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

To get insights into the function of RPAP3-Cter, we characterized its partners by performing a proteomic analysis in human cells. We fused this domain to GFP and stably expressed it in HeLa cells using site-specific Flp-In integration. Following differential labeling of GFP-RPAP3-Cter and control cells with isotopic amino-acids (SILAC), whole cell extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-GFP antibodies and pellets were subjected to quantitative mass-spectrometry analysis (Fig. 2a). About 20 proteins associated with RPAP3-Cter with high abundance

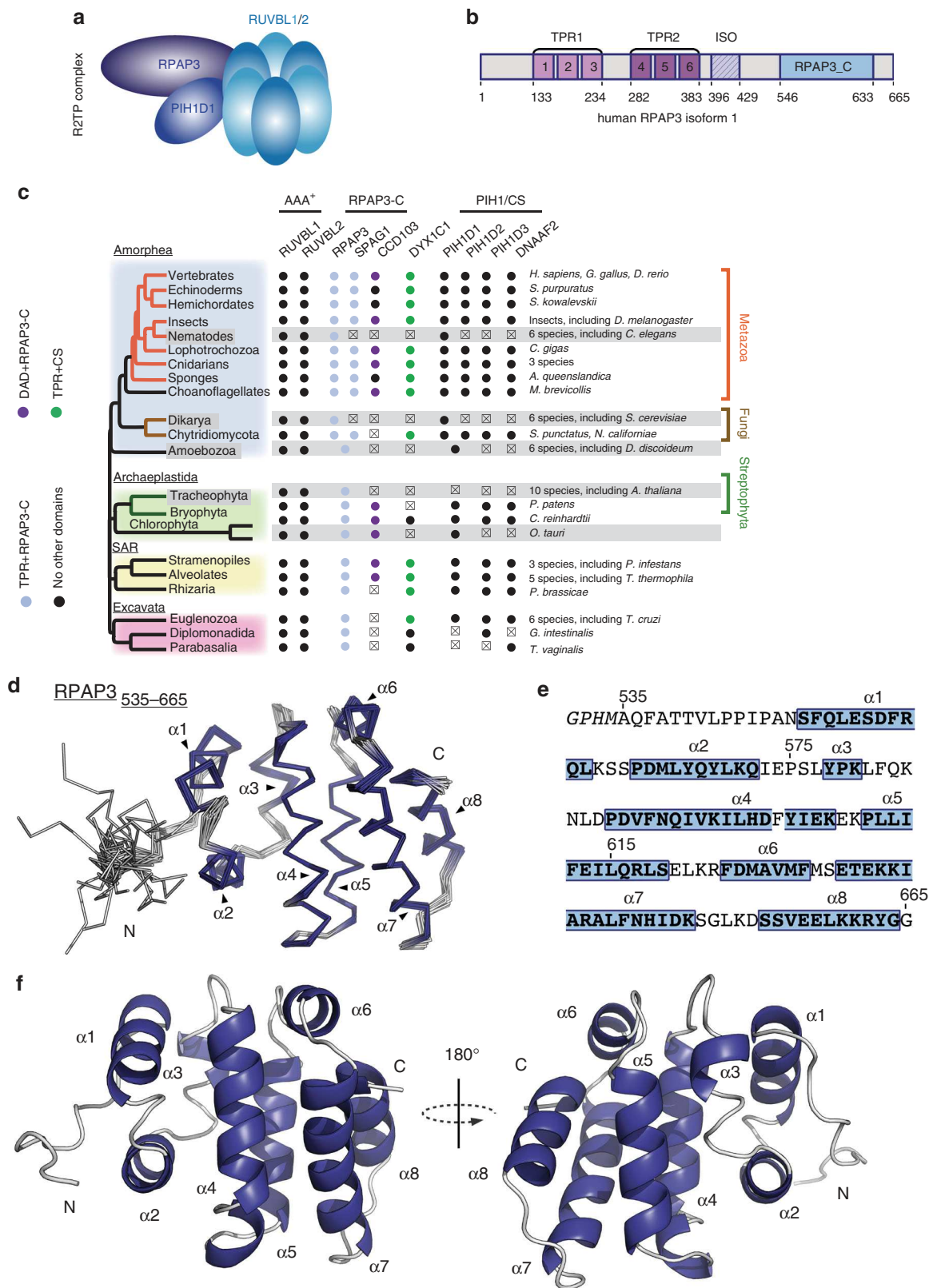


Fig. 1 Solution structure of the C-terminal domain of human RPAP3 **a** Schematic representation of the human R2TP complex. **b** Domain architecture of RPAP3 (numbering corresponds to amino-acids of isoform 1). **c** Conservation of RPAP3 and PIH repertoires across Eukaryotes. Members in which TPR (Pfam: 13414) or Dynein attachment (Pfam: 15867) domains are associated to the canonical RPAP3_C are colored as indicated at the left. Clades or species that have lost flagella or in which cilia are not motile are in gray background. Members that were not found are indicated by x. **d** Backbone view of the superposition of the best 20 NMR structures of human RPAP3-Cter, with α -helices indicated in violet. **e** Sequence of RPAP3-Cter, with corresponding α -helices. **f** Backbone orthogonal views (180 °C) of RPAP3-Cter structure in ribbon representation with corresponding α -helices

Table 1 NMR and refinement statistics for top-20 RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ structures

	RPAP3 ₅₃₅₋₆₆₅
NMR distance and dihedral constraints	
Distance constraints	
Total NOE	3707
Intra-residue	855
Inter-residue	2852
Sequential ($ i - j = 1$)	849
Medium-range ($ i - j \leq 4$)	1033
Long-range ($ i - j \geq 5$)	970
Total dihedral angle restraints	230
ϕ	110
ψ	120
Structure statistics after AMBER refinement	
Violations	
Distance constraints (Å)	0.10 ± 0.03
Dihedral angle constraints (°)	6.70 ± 1.94
Max. dihedral angle violation (°)	9.99
Max. distance constraint violation (Å)	0.14
Violation occurrences	
Distances constraints (> 0.2 Å)	0
Dihedral angle constraints (> 5°)	1.30 ± 1.26
R.m.s. deviations from idealized geometry	
Bond lengths (Å)	0.013 ± 0.00
Bond angles (°)	1.85 ± 0.05
R.m.s. deviation to best structure ^a (Å)	
All heavy atoms	1.33 ± 0.29
All backbone atoms	0.98 ± 0.38
Heavy atoms in secondary structures	0.94 ± 0.07
Backbone atoms in secondary structures	0.37 ± 0.05

^aPairwise r.m.s. deviation was calculated among 20 refined structures

(intensity) and specificity (SILAC ratio). The top hits were RUVBL1/2, while the others belonged to several classes: (i) known R2TP clients (SHQ1 and NOP58 for snoRNPs, PRPF8, and other U5 proteins for snRNAs, POLR2A for RNA polymerase II); (ii) known R2TP cofactors (ZNHIT2) and/or RUVBL1/2 partners (C12ORF45, C2ORF44, DPCD)^{6,17,21}; (iii) PAQosome subunit (PFDN2)²; and (iv) chaperones (HSP70 isoforms and its regulator BAG2). Overall, these data suggest that RPAP3-Cter may play an important role in interacting with RUVBL1/2 and some R2TP clients.

RPAP3-Cter directly binds RUVBL1/2. We then performed pairwise yeast two-hybrid assays (Y2H) between RPAP3-Cter and its putative partners (Supplementary Fig. 2A). We detected a positive signal with RUVBL2, but not with the other tested proteins. To determine whether this interaction is direct, we used recombinant proteins for in vitro binding assays. RUVBL1/2 were co-expressed in *E. coli* and they purified predominantly as a dodecamer (see below). We then assessed the binding to RPAP3-Cter using NMR spectroscopy. We took advantage of the ¹³C-labeling to monitor the effect of RUVBL1/2 on the methyl groups of RPAP3-Cter. Indeed, methyl groups are able to provide strong signals even at low protein concentrations and/or basic pHs³¹. The NMR signal of ¹³C-labeled RPAP3-Cter decreased dramatically in presence of RUVBL1/2 hetero-multimers (Fig. 2b), while only minor effects were seen with RUVBL1 or RUVBL2 alone (Supplementary Fig. 2B). Next, we used SPR and observed robust interactions between RPAP3-Cter and RUVBL1/2 hetero-multimers (Fig. 2c), with a K_D of 4.2 nM in a 1:1 interaction model calculation (Table 2). These data demonstrated that RPAP3-Cter binds heteromeric forms of RUVBL1/2.

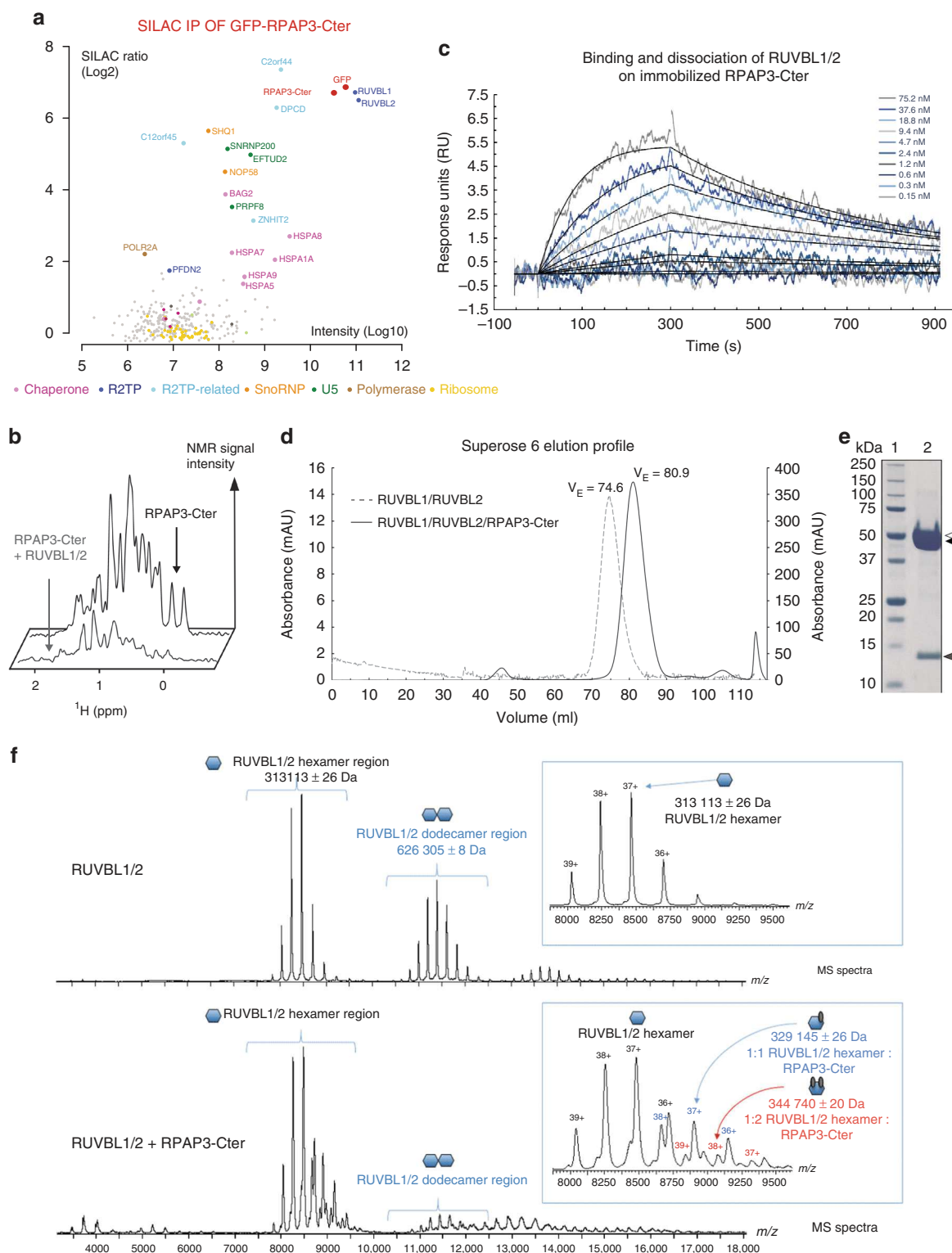
RUVBL1/2 cycle between hetero-hexamers and hetero-dodecamers²⁰, and we thus addressed the stoichiometry of the interaction. First, we co-expressed RPAP3-Cter with RUVBL1/2 in *E. coli* and analyzed the complex by gel-filtration (Fig. 2d, e). The eluting volumes of RUVBL1/2 alone and RUVBL1/2:RPAP3-Cter corresponded to molecular masses of dodecameric and hexameric forms of RUVBL1/2, respectively. Next, we performed mass spectrometry analysis under non-denaturing conditions (native MS), of either RUVBL1/2 alone, or RUVBL1/2 co-purified with recombinant RPAP3-Cter (Fig. 2f). In the free state, RUVBL1/2 formed hetero-hexameric and hetero-dodecameric complexes, but hexameric forms became largely dominant upon RPAP3-Cter binding. Note also that one hexamer can bind multiple RPAP3-Cter domains. These data indicate that RPAP3-Cter binds predominantly RUVBL1/2 hetero-hexamers.

Next, we analyzed the binding of RPAP3-Cter to RUVBL mutants altered in their ATPase cycle. For this, we turned to LUMIER interaction experiments. In this quantitative co-IP assay, the prey and bait proteins are respectively fused to Renilla luciferase (RL) and FLAG-tagged Firefly luciferase (3xFLAG-FFL). Following transient expression in human HEK293 cells, the bait is IP'ed with anti-FLAG antibodies, or without antibodies as control. The RL and FFL luciferase activities are then measured in the input and pellet, and the co-IP efficiency is expressed as the percent of prey co-immunoprecipitated, relative to that of the bait, providing a direct measurement of binding efficiencies (Supplementary Fig. 2D). In these experiments, we used canonical mutations of AAA + ATPases³², expected to prevent nucleotide binding (K to M mutant in the Walker A domain), nucleotide hydrolysis (E to Q in the Walker B-domain), or coupling between adjacent monomers (R to E in the Arg finger). The effect of several of these mutations was previously validated using the *Chaetomium thermophilum* orthologs of RUVBL1 and RUVBL2²⁰. Interestingly, while the K-M and R-E mutations had little effects on the association of either RUVBL1 or RUVBL2 with RPAP3-Cter, the E-Q mutations diminished binding (Supplementary Fig. 2D). Taken together, these data indicated that RPAP3-Cter made a direct, high-affinity interaction with hexameric RUVBL1/2. This interaction did not require nucleotide and was weakened in mutants deficient in ATP hydrolysis.

RPAP3-Cter binds R2TP clients through RUVBL1/2. Our proteomic analysis of RPAP3-Cter showed that it binds not only RUVBL1/2, but also a range of R2TP clients. To test whether these latter interactions depend on RUVBL1/2, we generated a series of RPAP3-Cter mutants. Structure-guided analysis selected solvent-exposed residues potentially involved in RUVBL1/2 interaction (Supplementary Fig. 3A, B). Alanine mutants were screened by Y2H assays, and two of them indeed lost interaction with RUVBL2 (Fig. 3a): R623A-M626A (Mut1) and F630A-S632A (Mut2). Both mutants localized similar to wild-type RPAP3-Cter (Supplementary Fig. 3C), suggesting no major alteration. The mutated residues are conserved across evolution (Supplementary Fig. 3D). They were located next to each other in the 3D structure of RPAP3-Cter (Fig. 3b), suggesting that they may constitute a conserved binding site for RUVBL1/2. LUMIER interaction assays confirmed the Y2H data, as both RPAP3-Cter Mut1 and Mut2 lost interaction with RUVBL1 and RUVBL2 (Fig. 3c). Next, we performed SILAC quantitative proteomic analyses of the RPAP3-Cter mutants. Remarkably, both mutants lost all of the RPAP3-Cter partners identified previously (Fig. 3d, e), with the exception of SHQ1 that remained weakly bound to RPAP3-Cter Mut1. Taken together, these data suggest that RUVBL1/2 are required for the association of RPAP3-Cter with its other partners.

Identification of RPAP3-like/PIH-like complexes. As described above, the human genome encodes two other proteins bearing RPAP3-Cter-like domains, SPAG1 and CCDC103, and three others containing PIH domains, PIH1D2, PIH1D3 and DNAAF2 (Fig. 1c, Fig. 4a). This suggested that these proteins could form R2TP-like complexes, by associating to each other and with RUVBL1/2 through their RPAP3-Cter-like domains. To test this possibility, we first performed systematic pairwise LUMIER co-IP assays between RPAP3-like and PIH-like proteins (Fig. 4b). In these tests, we also added DYX1C1 because this protein associates

with DNAAF2²⁹ and bears some structural features of RPAP3 and PIH1D1 (e.g., TPR and CS domains), although it lacks PIH and RPAP3-Cter domains. We also included the known splicing isoforms of DYX1C1 and RPAP3, including the RPAP3 isoform 2 that does not interact with PIH1D1³³. Finally, we added HSP70, HSP90, and STI1, a factor promoting the transfer of clients from HSP70 to HSP90³⁴. These proteins were fused at their N-termini to Renilla luciferase or to 3xFLAG-Firefly luciferase. The plasmids were transiently transfected in HEK293 cells, and LUMIER IPs were performed (Fig. 4b). As above, the interaction strength was



expressed as the fraction of co-IP'ed prey protein normalized to that of the bait. Negative controls included four unrelated proteins, which were tested against all the RPAP3-like and PIH-like proteins (Supplementary Fig. 4A). This allowed us to rigorously identify specific interactions (see Methods). These experiments revealed that all the TPR-containing proteins interacted with HSP70, HSP90 and STIP1, although the co-IP efficiency was low (Fig. 4b and S4B). This could be due to a low affinity or to the fact that HSPs have many partners that potentially compete with baits in extracts. Most interestingly, we uncovered three strong associations between RPAP3-like and PIH-like proteins (30–40% of co-IP efficiencies): RPAP3-iso-1 with PIH1D1, DYX1C1-iso-a with DAAF2, and SPAG1 with PIH1D2. Two other strong interactions were found, between DYX1C1-iso-c and PIH1D3, and between DAAF2 and SPAG1, although the IP efficiencies were 5–10 times less than for the previous couples (4–8% of co-IP efficiencies). Finally, a number of weak but significant interactions were also found (Fig. 4b and S4C), suggesting that additional PIH1D1-like/RPAP3-like pairs may also form, albeit at low efficiencies.

PIH1D2 facilitates the binding of SPAG1 to RUVBL1/2. We then tested whether SPAG1 and CCDC103 would bind RUVBL1/2, also using LUMIER assays (Fig. 4c). SPAG1, RPAP3-iso-1 and iso-2 interacted with both RUVBL proteins, while CCDC103 did not. Surprisingly however, the isolated C-terminal domain of SPAG1 failed to interact with RUVBL1 or RUVBL2. The C-terminal domains of RPAP3, SPAG1, and CCDC103 have an overall identity of only 25%, and the sequence differences may modulate their affinity for RUVBL1/2, from a high affinity binding for RPAP3-Cter, to a low or no binding for SPAG1-Cter and CCDC103-Cter. Indeed, the amino-acids required for the binding of RPAP3-Cter to RUVBL1/2 are not strictly conserved in SPAG1 and CCDC103 (Supplementary Fig. 3B). Since the full-length SPAG1 protein bound better to RUVBL1/2 than the isolated SPAG1-Cter domain, we further tested whether its PIH1D2 partner would enhance binding. We repeated the LUMIER assay in presence of co-expressed, untagged PIH1D2 (Fig. 5a). Indeed,

PIH1D2 increased the binding of SPAG1 to RUVBL1 and RUVBL2 by nearly 3-fold, achieving a binding efficiency similar to that of full-length RPAP3. Taken together, these data indicate that SPAG1 binds RUVBL1/2 and that the binding determinants likely include several regions within SPAG1 and PIH1D2.

This result prompted us to test whether the PIH-like proteins would interact with RUVBL1/2. LUMIER assays indicated that significant interactions could be detected (Supplementary Fig. 4D), but at a low level (5–20 fold weaker than with RPAP3).

Human cells contain several complexes related to R2TP. The LUMIER assays indicate that SPAG1 can interact with PIH1D2 and RUVBL1/2, possibly forming a complex similar to R2TP. To obtain direct evidence that this complex exists, and to determine whether additional R2TP-like complexes may form, we turned to quantitative SILAC proteomics. We fused GFP to PIH1D2, PIH1D3, DAAF2, and CCDC103, stably expressed the fusions in HeLa cells and used them as baits in proteomic experiments (Fig. 5b and Supplementary Data 1). We did not find any partner for GFP-CCDC103. For GFP-PIH1D3, we found a strong association with LRIF1, a nuclear factor enriched in testis. Only minute amounts of RUVBL1/2 were detected, in agreement with the weak interaction observed in the LUMIER assays. DYX1C1-iso-c was also not detected, possibly because of its low abundance in HeLa cells (Gtex dataset³⁵). For GFP-DAAF2, we found a strong association with DYX1C1-iso-a, and again a weak binding to RUVBL1 and RUVBL2 that agreed with the LUMIER assays (Fig. 4b and S4C). In the GFP-PIH1D2 IP, the three most prominent proteins were SPAG1, RUVBL1 and RUVBL2, all found with both a high specificity and abundance (Fig. 5b). HSP70 and its regulator BAG2 were also significantly enriched. This indicated the existence of an R2TP-like complex containing PIH1D2, SPAG1, RUVBL1/2, which associated with HSP70 chaperones. The other GFP-PIH1D2 partners found in this experiment were involved in a variety of processes ranging from metabolism to RNA processing, and may represent clients of this chaperone system. No prefoldin nor prefoldin-like proteins were detected,

Table 2 RUVBL1/2:RPAP3-Cter affinity and kinetic interaction parameters determined by SPR

His_RUVBL1_Flag_RUVBL2 interaction with immobilized RPAP3-Cter

K_D (M)	k_d (s^{-1})	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	n^a
$4.18 \times 10^{-9} \pm 1.96 \times 10^{-9}$	$1.12 \times 10^{-3} \pm 2.58 \times 10^{-4}$	$2.97 \times 10^5 \pm 6.35 \times 10^4$	3

^a n stands for triplicate

Fig. 2 RPAP3-Cter interacts with RUVBL1/2 hexamers. **a** SILAC proteomic analysis of RPAP3-Cter. The graph depicts the proteins identified in anti-GFP immuno-precipitates of HeLa cells expressing GFP-RPAP3-Cter. Each dot is a protein and the color code is indicated below the graph. X-axis: protein abundance (Log10 of signal intensity); y-axis: enrichment over a control IP (Log2 of SILAC ratio). **b** NMR interaction analysis of RPAP3-Cter with recombinant RUVBL1/2 complex. The graph depicts 1D NMR METHYL-SOFAST-HMQC spectra in the methyl region of ¹³C-labeled RPAP3-Cter alone (top lane) or mixed with recombinant RUVBL1/2 complex (bottom lane). Intensity of the NMR signal (arbitrary units, Y-axis) is plotted against the ¹H chemical shift (in ppm, X-axis). **c** SPR binding assays of RPAP3-Cter with RUVBL1/2. The graph depicts the response upon injecting the RUVBL1/2 complex ($t = 0$ s), or upon washing ($t = 300$ s), on immobilized RPAP3-Cter. X-axis: time (s); Y-axis: response (arbitrary units). These data have been obtained with the same batch of RUVBL1/2 complex as in the control experiment (Fig. S2E, F). **d** Chromatographic analysis of the RUVBL complexes. The graph depicts the chromatograms of purified RUVBL1-RUVBL2 (dashed gray, left Y axis) or RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter (black line, right Y axis), on a Superose 6 16/70 XK. X-axis: elution volume; Y-axis: absorbance. **e** Electrophoresis of the purified RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter complex. The gel shows the peak fraction of the complex eluted from the column (black line in d), with a purity estimated to -95 %. Lane 1: Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad); Lane 2: denatured RUVBL1-RUVBL2-RPAP3-Cter complex. Black and white arrows: RUVBL1 and RUVBL2 (52 and 53 kDa, respectively); gray arrow: RPAP3-Cter (15 kDa). **f** Native mass spectrometry analysis of recombinant RUVBL complexes. The upper mass spectrum presents the purified RUVBL1/2 complex. The bottom mass spectrum presents the same complex after addition of RPAP3-Cter. Y-axis: signal intensity; X-axis: m/z. Insets: zoom over the 8000–9000 m/z region. Schematics depict the complex observed. Blue: RUVBL proteins; red: RPAP3-Cter

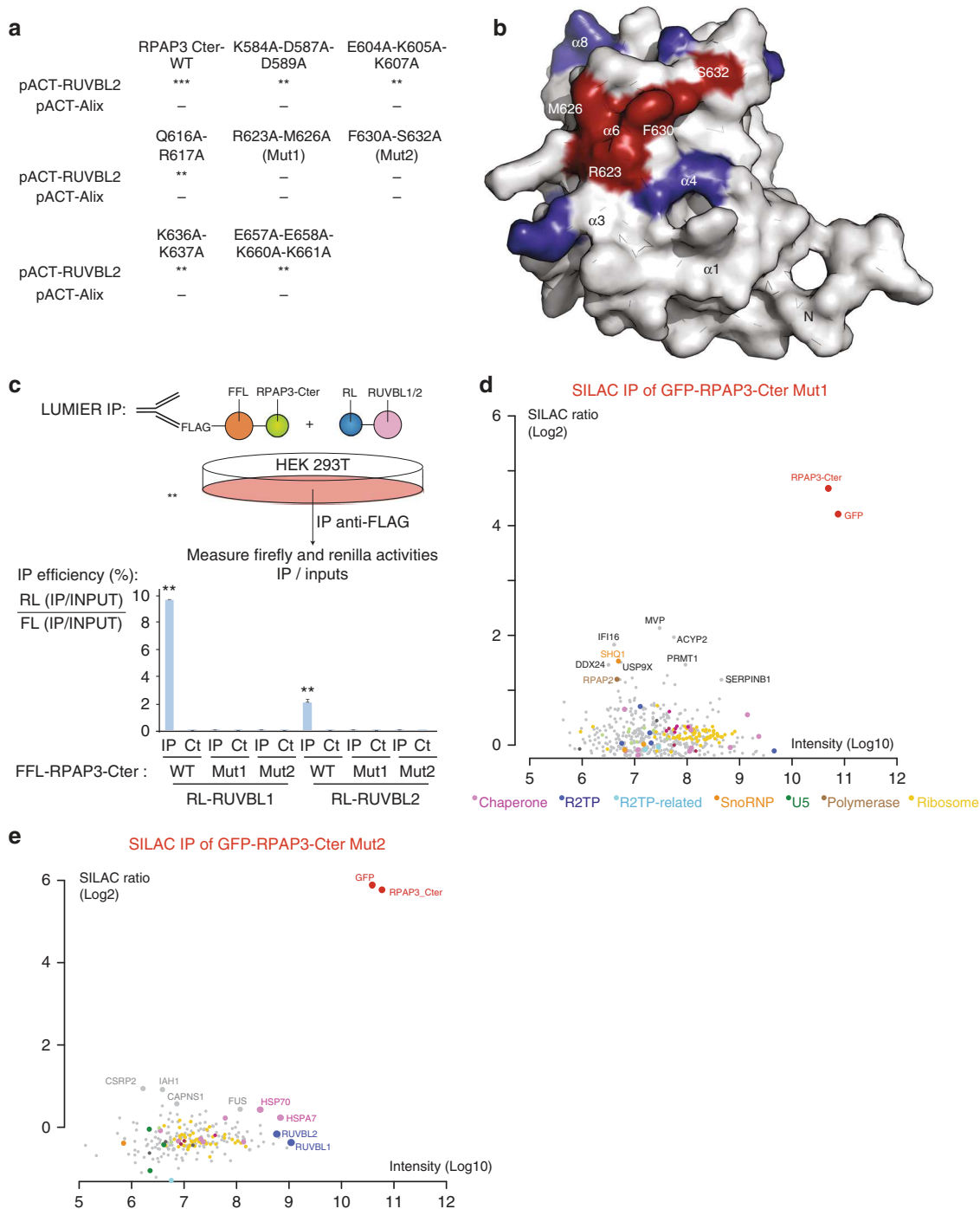


Fig. 3 The RPAP3 C-terminal domain interacts with R2TP clients via RUVBL1/2 multimers. **a** Yeast two-hybrid analysis of interactions between RUVBL2 and RPAP3-Cter mutants. Alix is a negative control. ***: strong interaction; **: medium; *: weak; -: no interaction. **b** Molecular surface representation of RPAP3-Cter structure by specifying the location of the mutants that lost interaction with RUVBL1/2. **c** LUMIER assay showing the in vivo interaction between RPAP3-Cter and RUVBL1/2 mutant proteins. Top panel: schematic representation of the assay. Bottom panel: graph plotting the IP efficiency of the indicated proteins. The values are the IP efficiencies of the co-precipitation of the RL fusion proteins (IP/Input), normalized by the IP/Input values obtained with the anti-FLAG IP of the 3xFLAG-FFL fusion protein. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly greater than six-times the mean value obtained in the control IPs without anti-FLAG antibody (Ct). ***p*-value < 0.001 (Z-test). **d,e** SILAC proteomic analysis of the partners of RPAP3-Cter-Mut1 and RPAP3-Cter-Mut2, respectively. Legend as in Fig. 2a

but we noted that an interaction of SPAG1 with WDR92 has been previously described²¹.

Collectively, the LUMIER and proteomic data thus defines three types of complexes related to R2TP (Fig. 5c). A first complex is composed of RPAP3-iso-2 in association with

RUVBL1/2. This complex is identical to the canonical R2TP except that it lacks PIH1D1, and was thus named R2T. A second complex comprises SPAG1, PIH1D2 and RUVBL1/2. This complex shares an organization similar to R2TP and was named R2SP. Another related complex could form with SPAG1,

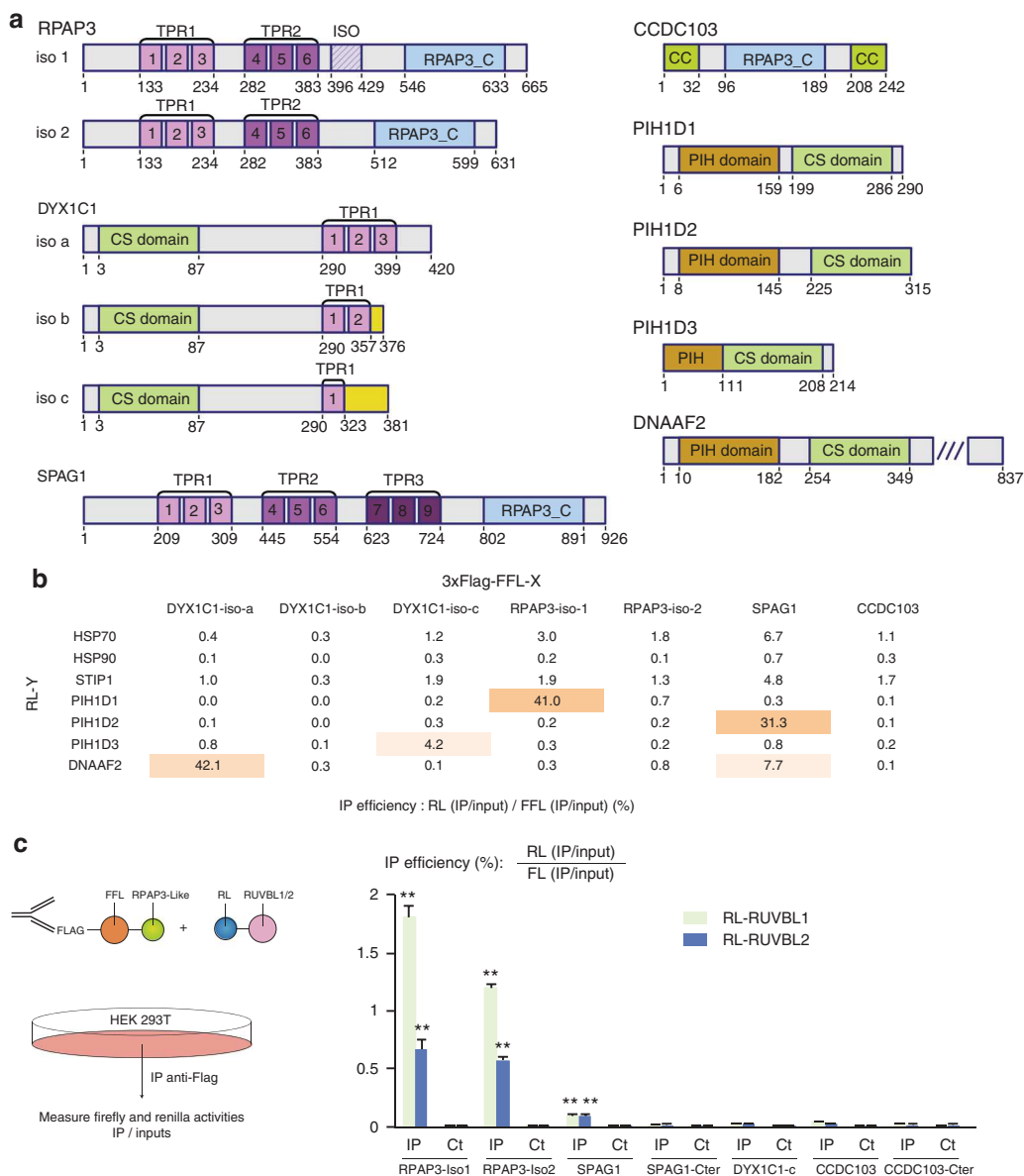


Fig. 4 RPAP3-like and PIH1-like proteins interact with each other. **a** Architecture of the human proteins containing a RPAP3-C-terminal domain (RPAP3-C), or a PIH domain (PIH). Coiled-coil (CC), CHORD-containing proteins and SGT1 domain (CS) and TPR domains (TPR) are also indicated. Different splicing isoforms of RPAP3 and DYX1C1 are shown, with their variable domains in hatched violet (RPAP3), or yellow (DYX1C1). **b** Summary of pairwise LUMIER interaction assays between the indicated proteins. The values are the efficiencies of the co-precipitation of the RL fusion proteins (IP/Input), expressed in percent of the efficiencies obtained with the 3xFLAG-FFL fusions. *p*-values are shown in Supplementary Fig. 4C. **c** LUMIER interaction assays between RL-RUVBL1/2 and RPAP3-like proteins tagged with 3xFLAG-FL. Legend as in Fig. 3c. Stars: values significantly greater than six-times the mean value obtained in the control IP (Ct). ***p*-value < 0.001 (Z-test)

DNAAF2 and RUVBL1/2 (i.e., an R2SD complex). However, this complex remains hypothetical since it was detected in LUMIER but not in proteomic experiments. Finally, we observed two heterodimers containing a PIH-like protein associated with a DYX1C1 isoform: DNAAF2/DYX1C1-iso-a and PIH1D3/DYX1C1-iso-c. These interactions were previously reported^{29,36}, but the isoform specificity of DYX1C1 was not known.

The occurrence and composition of these complexes is corroborated by our evolutionary analyses (Fig. 1c). The parallel duplication leading to RPAP3 and SPAG1 on one side, and PIH1D1 and PIH1D2 on the other, is consistent with their respective incorporation into R2TP and R2SP. Similarly, some species contain an RPAP3 ortholog but lack a PIH1D1/PIH1D2 gene, thus mirroring the existence of R2T in human cells. The frequent co-

occurrence of DYX1C1 with either DNAAF2 or PIH1D3 is also consistent with the association observed for the human proteins.

R2TP-like components are enriched in testis. To gain insights into the function of these R2TP-related complexes, fluorescent microscopy was performed with the stable cells expressing the GFP-tagged proteins. These proteins localized to different cellular areas, suggesting specialized functions (Supplementary Fig. 5). Interestingly, DYX1C1-iso-c was nuclear and concentrated in punctate structures, as did its partner PIH1D3. It is also worth noting that RPAP3-iso-2 was mainly nuclear while RPAP3-iso-1 was mainly cytoplasmic. Thus, alternative splicing determines not only the partners but also the localization of these proteins.

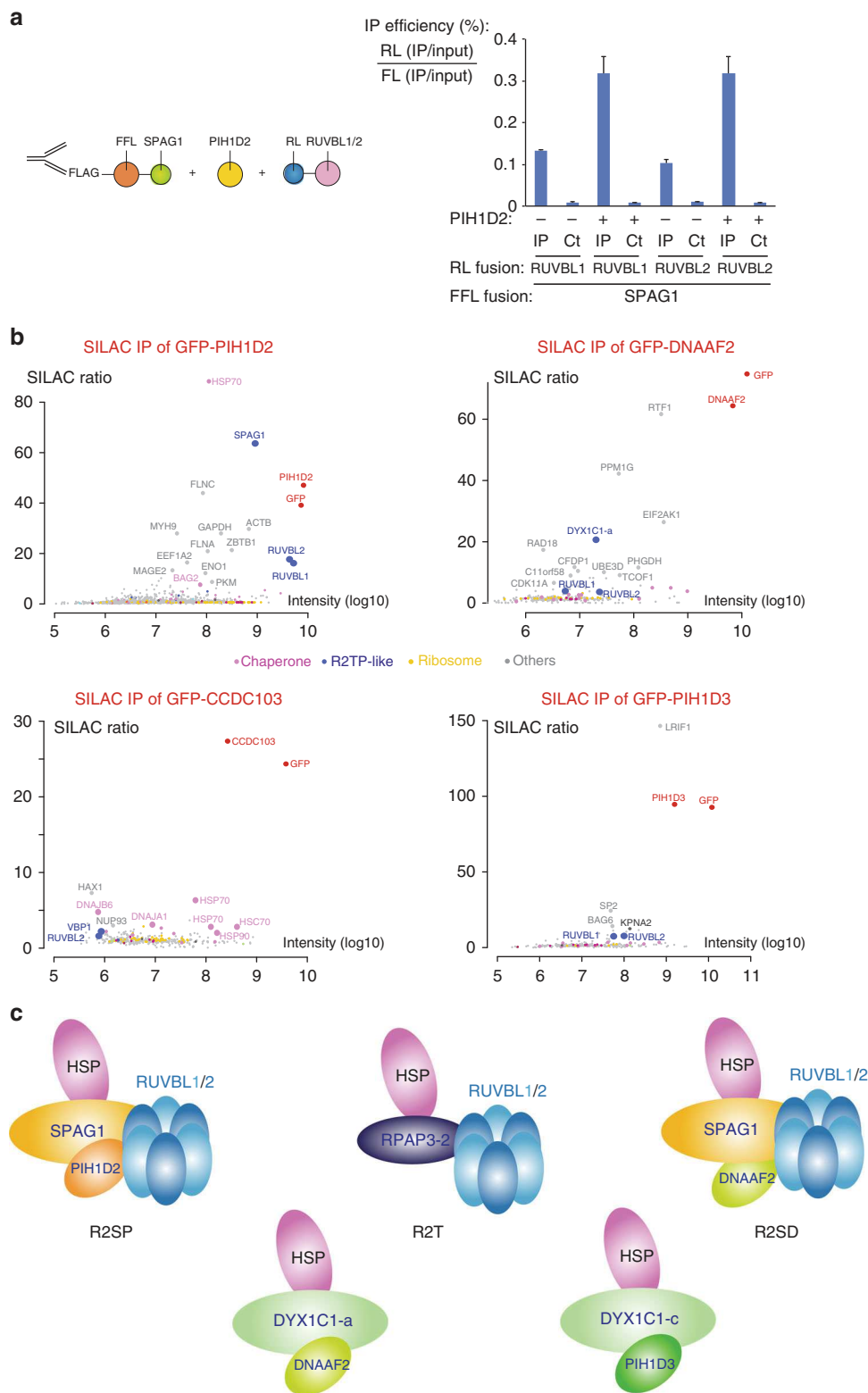


Fig. 5 Identification of R2TP-like complexes. **a** LUMIER interaction assays between SPAG1 and RUVBL1/2. Legend as in Fig. 3c excepted that an untagged PIH1D2 was co-expressed (lanes+), or SMD1 as control (lanes-). **b** SILAC proteomic analysis of the partners of GFP-PIH1D2, GFP-DNAAF2, GFP-CCDC103, and GFP-PIH1D3, performed in HeLa cells. Legend as in Fig. 2a. The color code is indicated between the graphs. **c** Models of possible R2TP-related complexes

Next, we examined existing data to determine in which tissues these factors are expressed (Gtex dataset³⁵; Supplementary Fig. 6A). The expression patterns of RUVBL1, RPAP3, and PIH1D1 looked similar to each other, with a rather ubiquitous

expression. DNAAF2 and SPAG1 were also broadly expressed, but with a moderate enrichment in testis. Interestingly, PIH1D2, PIH1D3, and RUVBL2 were highly expressed in testis, suggesting an important role in this organ.

PIH1D2 has both ubiquitous and testis-enriched partners. To characterize the function of R2SP, we first searched for partners by performing yeast two-hybrid screens using PIH1D2 as bait. Given its expression pattern, we screened two human libraries, from lung cancer cell lines and from testis (Fig. 6a). The screens revealed a total of >60 potential partners (46 from the lung and 32 from testis; Fig. 6a and Supplementary Data 2). Nine proteins were found in both libraries, including SPAG1, indicating the high quality of the screens. These PIH1D2 partners are involved in a variety of functions, ranging from DNA metabolism, transcription and RNA processing, and up to cytoskeletal organization, membrane-related processes and trafficking.

Next, we selected 16 proteins to test LUMIER assays and could validate most of them (Fig. 6b). Taken together, these data demonstrated that PIH1D2 has a range of partners involved in a variety of processes. Some partners were enriched in testis and others were ubiquitous (Gtex dataset³⁵, Fig. 6b).

R2SP facilitates quaternary protein folding. Next, we tested whether R2SP has a chaperone activity toward its partners. Since PIH1D2 is poorly expressed in HeLa cells, in contrast to the other components of R2SP (Supplementary Fig. 6B), we generated HeLa cells stably expressing GFP-PIH1D2, and thus having a fully assembled R2SP complex (see Fig. 5b). To measure its chaperone activity, we fused to Firefly luciferase the PIH1D2 partners previously identified, and we transiently transfected them in HeLa-PIH1D2 and parental HeLa cells. Remarkably, five fusions were significantly more expressed in presence of GFP-PIH1D2, reaching a threefold increase in one case (Fig. 7a). These were PPFIA2 (liprin- α 2), ZBTB1, TCP11, PATL1 and PIK3CB. In contrast, the expression of a broad series of control proteins, including unrelated factors (Alix, FFL) or known R2TP-substrates (EFTUD2, PRPF31, NOP58), was identical in both cell lines (Fig. 7a). Next, we repeated the experiments at 32 °C, the optimal temperature of testis where PIH1D2 is highly expressed. The effects of R2SP on proteins levels were generally more important at this temperature. Altogether, this suggested that R2SP enhanced expression of some of its partners and had a stronger effect at the testis temperature.

Since R2TP is involved in the assembly of its target complexes², we hypothesized that R2SP could do the same. To test this, we focused on liprin- α 2 (PPFIA2). Indeed, this is the strongest binder of PIH1D2 and it is also the most sensitive to the presence of PIH1D2. In addition, liprins are important scaffolding molecules that bring together a diverse set of factors in order to control cell adhesion, cell migration, and organization of the active synaptic zone³⁷. Liprins possess a long coiled-coil domain at their N-terminus, followed by a linker and three Sterile Alpha Motif domains (SAM). The coiled-coil domain of liprin- α 2 can dimerize or heteromerize with liprin- α 1 and α 3³⁸. This domain also binds several proteins, including RIMS1, a protein involved in the docking of exocytic vesicles^{37,39}. The SAM domain of liprin- α 2 interacts with the kinase CASK, as well as with the tyrosine phosphatases LAR (PTPRF), PTPRD and PTPRS³⁸. In addition, it can simultaneously interact with liprin- β to organize higher order molecular assemblies³⁹.

We first determined whether R2SP could interact with the partners of liprin- α 2. We fused liprin- α 1, liprin- β 2 (PPFIBP2), CASK and RIMS1 to Renilla Luciferase and to flagged Firefly Luciferase, and performed LUMIER assays with R2SP subunits (Fig. 7b). Indeed, CASK, liprin- β 2 and RIMS1 interacted with SPAG1. Next, we tested whether R2SP would facilitate the association of liprin- α 2 with its partners. FLAG-FFL-liprin- α 2 was transfected in HeLa and HeLa-PIH1D2 cells, and LUMIER IPs were performed with RL-tagged liprin- α 2 partners. Of note, a

larger amount of the FLAG-tagged liprin- α 2 plasmid was transfected in HeLa cells to compensate for its lower level of expression in this cell line, such that a similar ratio of bait over preys was obtained in HeLa and HeLa-PIH1D2 cells. The efficiency of co-precipitation of liprin- α 1 by liprin- α 2 was similar in HeLa and HeLa-PIH1D2 cells. In contrast, liprin- β 2, CASK, RIMS1 and PTPRS were all co-precipitated more efficiently by liprin- α 2 in HeLa-PIH1D2 cells (2.3–3.9 fold; Fig. 7c). These data demonstrate that the presence of PIH1D2, and thus of a full R2SP complex, promotes the association of liprin- α 2 with several of its targets. This indicates that R2SP is involved in quaternary protein folding.

Discussion

R2TP is a conserved HSP90 co-chaperone that is involved in the assembly of key cellular complexes². *S. cerevisiae* and human R2TP share a similar organization but striking differences distinguish their RPAP3/Tah1p subunit. Human RPAP3 contains two central TPR domains that bind HSP70 and HSP90, and we show here that its C-terminal domain adopts a helix-bundle fold and bind RUVBL1/2 hexamers. In contrast, *S. cerevisiae* Tah1p is six times smaller than human RPAP3 and consists of a single short TPR domain that functions as an adapter between Hsp90 and Pih1p^{15,25}. In particular, Tah1p lacks the RPAP3-Cter homology domain and consequently, the Rvb ATPases are mainly recruited by Pih1p in yeast^{26,28}. This structural difference likely translates into different functions. In *S. cerevisiae*, *TAH1* knock-out displays much milder phenotypes than *PIH1*⁴⁰, while *Drosophila* and mouse *RPAP3* are essential genes (⁴¹ and unpublished observations).

The PIH domain of PIH1D1 recruits some client proteins via a phosphopeptide-binding pocket that binds DSpDD/E motifs^{14,15}. We show here that RPAP3-Cter binds a large number of R2TP clients and is thus also involved in client recruitment. Interestingly, binding of these clients is lost in RPAP3 mutants that no longer bind RUVBL1/2. RPAP3-Cter could make cooperative interactions with RUVBL1/2 to bind the clients, or it may only bind the ATPases, which would in turn recruit the clients. An interesting possibility would be that RPAP3-Cter maintains the ATPases in a conformation suitable for client binding, in a manner analogous to CDC37 for HSP90⁴². In agreement with this idea, RPAP3-Cter has different affinities for RUVBL mutants locked at different stages of their ATPase cycle.

It was recently proposed that the RUVBLs cycle between single and double ring structures and that this may give them chaperone activity¹⁶. Interestingly, dimerization of the hexameric rings involves their DII domains, and a recent cryo-EM structure of the *S. cerevisiae* R2TP complex revealed that the Tah1p:Pih1p heterodimer also associates with this domain. The position of Tah1p:Pih1p thus appears ideal to regulate the formation of double ring structures. Given the very different interaction of human RPAP3-PIH1D1 with RUVBL1/2, it will be interesting to determine whether a similar structural arrangement is conserved in human R2TP.

SPAG1 has an organization similar to RPAP3, with three TPR domains preceding the RPAP3-Cter-like domain. We show here that SPAG1 forms an R2TP-like complex with RUVBL1/2 and PIH1D2, which we termed R2SP. Our two-hybrid screen indicates that a short region downstream the third TPR of SPAG1 is involved in PIH1D2 binding (Supplementary Data 2). Interestingly, the difference between the two isoforms of RPAP3 occurs at a similar location, and this region also determines binding to PIH1D1 (ref. ³³ and Fig. 4b). This is reminiscent of the binding of Tah1p to Pih1p, where a short C-terminal region of Tah1p, located immediately downstream the TPR, interacts with the CS

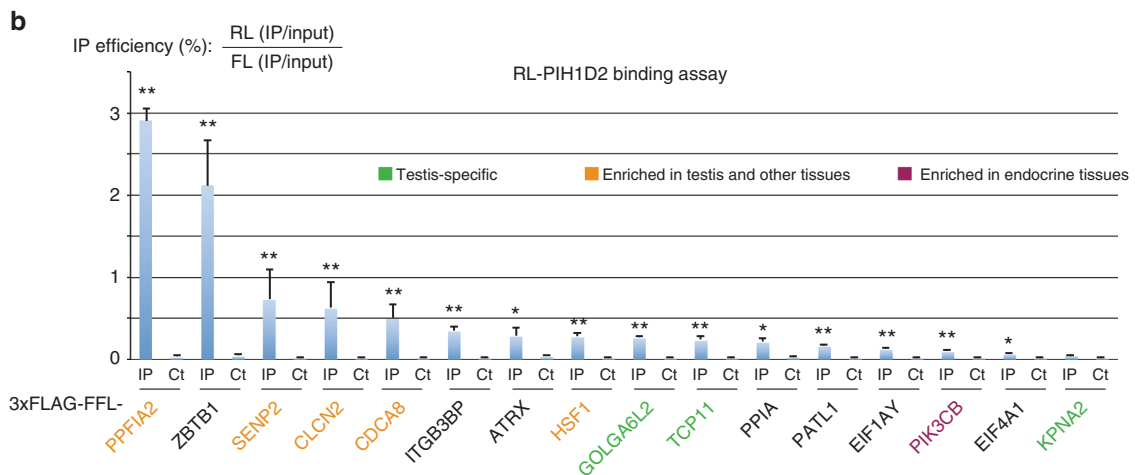
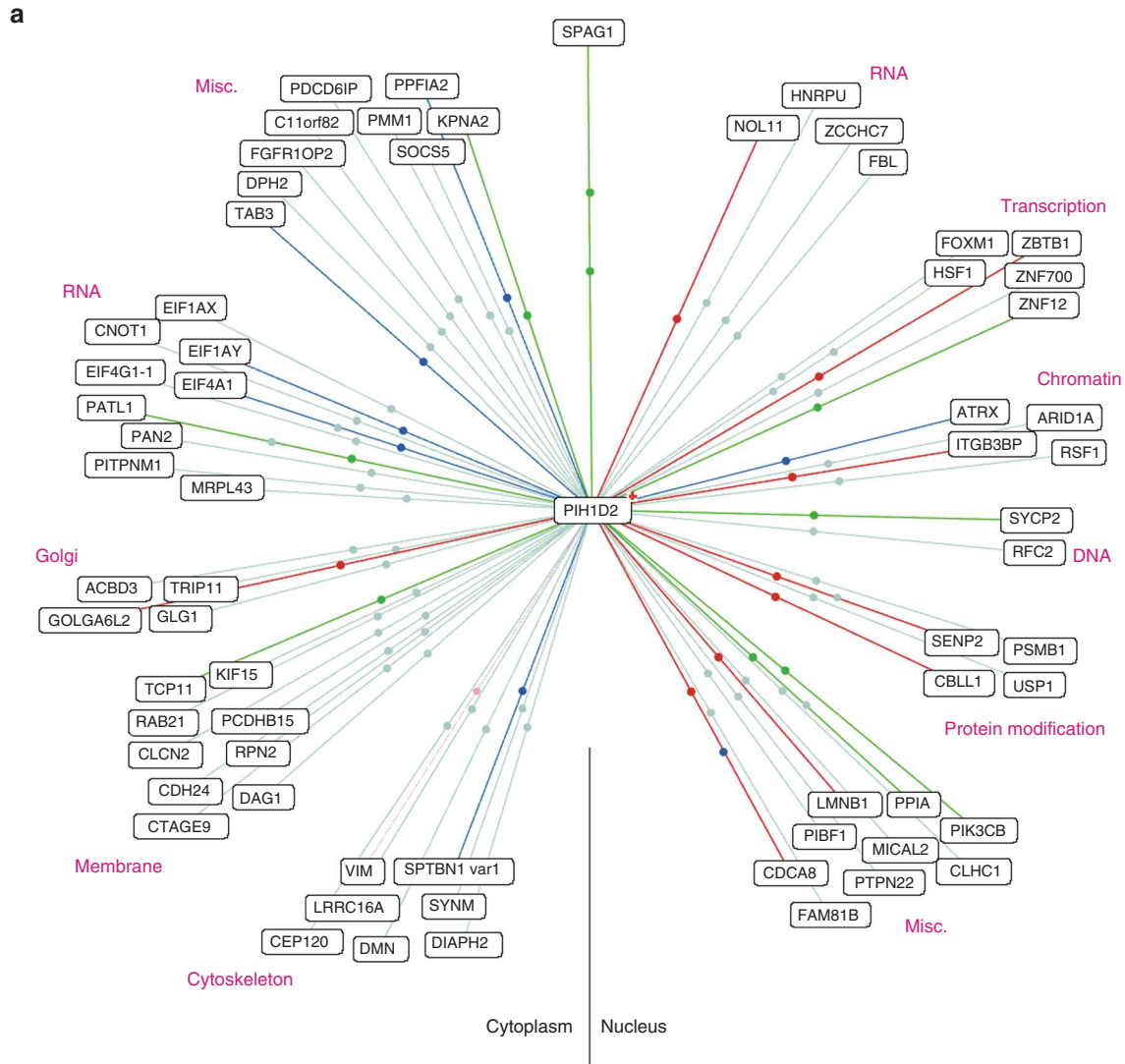
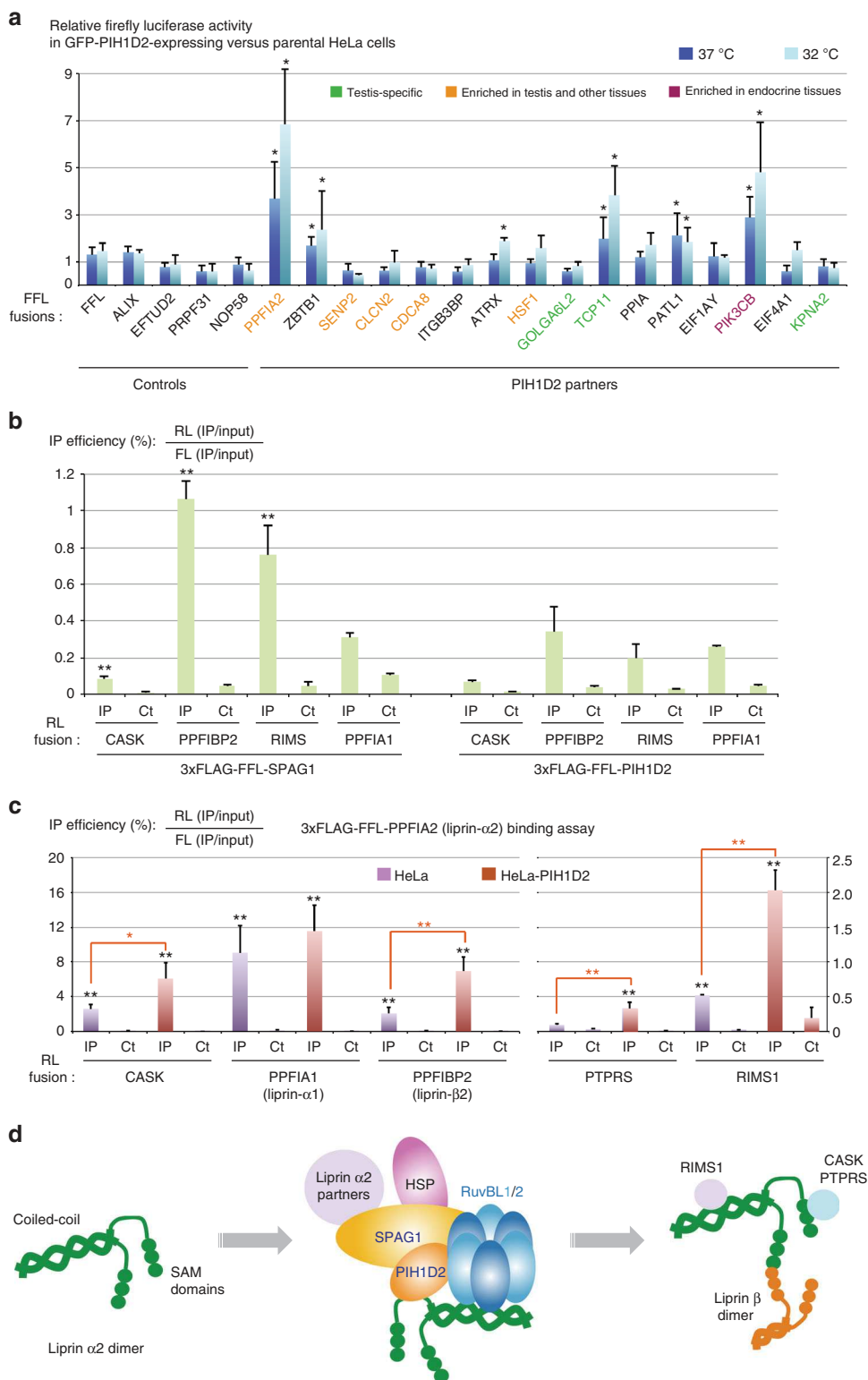


Fig. 6 Identification of PIH1D2 partners. **a** Results of yeast two-hybrid screens using human PIH1D2 as bait and performed with human libraries from lung carcinoma cell lines and testis. The color of the lines indicate the strength of the Y2H interaction (PBS score). a red; b dark blue; c green; d light blue. Lines with two dots indicate that the prey was found in the two libraries. **b** Validation of the hits found in the yeast two-hybrid screens by LUMIER co-IP assays. The graph depicts the results of LUMIER co-IP assays performed with the indicated proteins. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly greater than six-times the mean value obtained in the control IPs without anti-FLAG antibody (Ct). **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.001 (Z-test)

domain of Pih1p^{15,25}. Taken together, these data suggest a model in which PIH-like and RPAP3-like proteins interact via an interface composed of a CS-domain on one side and a short region downstream the TPRs on the other. This type of interaction may also extend to DYX1C1 since its three isoforms, which differ in TPR domains and the downstream flanking region, interact with different PIH partners.

Our interaction assays indicate that cells may contain other related complexes. First, an R2T complex that contains RPAP3-

iso-2 and RUVBL1/2 but lacks a PIH1-like component. This complex may be specialized in nuclear functions. Second, an R2SD complex composed of SPAG1, DNAAF2 and RUVBL1/2. It was not detected in our proteomic analyses and may thus form only in specific cell types. Finally, DYX1C1 isoforms associate with DNAAF2 and PIH1D3 but apparently without binding the RUVBLs. We do not exclude the possibility that additional proteins may be present, as the prefoldins in the case of R2TP. Overall, this study highlights the variety of R2TP-like complexes.



With the exception of PIH1D2, all the R2TP-related proteins analyzed here have been previously linked to the formation of cilia and to the assembly of axonemal dyneins^{29,36,43}. Our and previous evolutionary analysis showed a loss of these proteins specifically in species lacking cilia (Fig. 1c and ³⁰). However, several lines of evidence suggest that they have additional functions: (i) R2SP interacts and is involved in the biogenesis of proteins unrelated to cilia function; (ii) the strongest proteomic partner of DAAF2 is RTF1, which is a nuclear protein involved in transcription; (iii) our CCDC103 two-hybrid screen performed with a testis library revealed only a few proteins related to cilia function (see Supplementary Data 2); (iv) GFP-tagged PIH1D3 and DYX1C1-iso-c are predominantly nuclear, with an accumulation in uncharacterized nuclear dots. In the future, it will be interesting to characterize the various functions of these R2TP-related proteins and to determine the balance of direct and indirect effects in cilia formation.

R2SP enrichment in testis could be due to two reasons: (i) it has testis-specific clients; (ii) it helps ubiquitous proteins to adapt the particular environment of testis. Our data suggest that both possibilities occur, since some putative clients of R2SP are enriched in testis, while others are ubiquitous. Indeed, some clients exhibited a stronger dependency on R2SP at 32 °C, the temperature of testis. This suggests that proteins selected to function at 37 °C may require additional help to function at 32 °C.

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

Liprin- α 2 is a conserved scaffolding protein expressed in the brain and to a lesser extent in testis (Gtex Portal,³⁵). It plays an important role in neurons, where it participates to the organization of the synaptic active zone and in the coordinated exocytosis of pre-synaptic vesicles⁴⁴. Interestingly, the acrosomal reaction also requires the simultaneous exocytosis of a large number of vesicles, and this process is also dependent on liprins⁴⁵. A parallel has been thus drawn between the synapse and the acrosome, leading to the term acrosomal synapse⁴⁶. Since PIH1D2 is also expressed in the brain, it will be interesting to determine whether R2SP participates to synaptic transmission, through its action on liprins.

Methods

Cell culture. HeLa Flp-In cells were a gift of S. Emiliani (Institut Cochin, Paris)⁴⁷. HEK293 cells were from the ATCC collection. HeLa Flp-In and HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), glutamin (2.9 mg/ml), and penicillin/streptomycin (10 U/ml), at 37 °C, 5% CO₂. For SILAC, a 3 \times -FLAG-GFP tag was fused at the N-terminus of the indicated proteins and the fusions were stably expressed in HeLa H9 cells by Flp-In

recombination, using the CMV promoter to drive expression⁴⁸. Clones were selected in hygromycin (150 μ g/ml), picked individually and characterized by Western blots and fluorescence microscopy.

Plasmids and cloning. DNA cloning was performed using standard techniques and with the GatewayTM system (Invitrogen). For pairwise two-hybrid tests, plasmids were based on pACTII and pAS2 Δ ⁴⁸. For the LUMIER assays, the baits and preys were expressed in HEK293 cells from the CMV promoter for the 3 \times FLAG-FFL fusions, or from the mouse L30 promoter for the RL fusions. The cDNAs were all of human origin except for RUVBL1 and RUVBL2, which were from mouse. Plasmids for in vitro expression in *Escherichia coli* are described below. Detailed maps and sequences are available upon request. RUVBL1, RUVBL2 are cloned in the pETDuet vector (Novagen) by manufacturer (GenScript) between *Nco*I and *Hind*III, and *Nde*I and *Xho*I, respectively. RPAP3-Cter PCR-amplified fragment were cloned between the *Nde*I and *Bam*HI sites in custom pET-Based vector (pNEA-3CH,⁴⁹) (Supplementary Table 1).

Purification of the human RUVBL1-RUVBL2. RUVBL1 carries an N-terminal 6 \times His-tag followed by thrombin cleavage site, while RUVBL2 has an N-terminal FLAG-tag followed by a TEV cleavage site. The RUVBL1-RUVBL2 complex was expressed in *Escherichia coli* (DE3) (Novagen, 71400), with 100 μ M IPTG overnight at 18 °C. The complex was immobilized in a 5 ml HisTrapTM HP (GE Healthcare) and eluted with 300 mM imidazole. Anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma) was used as a second affinity step. FLAG_FH8 tag was cleaved by incubating 18 h at 4 °C with 1% (w/w) HRV-3C protease (Thermo Fisher Scientific). Two size exclusion steps separated oligomeric species, FLAG_FH8 and protease. Superdex S200 and Superose 6 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM MgCl₂ and 0.5 mM TCEP resulted in a stable dodecameric complex eluting as a single peak from Superose 6 (Supplementary Fig. 2C).

Purification of the human RUVBL1-RUVBL2-RPAP3 complex. RUVBL1 and RUVBL2 were co-expressed *E. coli* (DE3; Novagen, 71400) containing the pRARE2 plasmid, during 24 h at 30 °C in EnPresso[®] B animal-free Media (BioSilta), by adding 100 μ M of IPTG, in a New Brunswick[™] (Innova[®]) 44R Shaker at 225 rpm. RUVBL1 was described previously⁵⁰, while RUVBL2 carried a C-terminal FLAG_FH8 Tag⁵¹ preceded by a Human Rhino 3C cleavage site (HRV-3C). RPAP3⁵³⁵⁻⁶⁶⁵ did not any tag.

The RUVBL1-RUVBL2-RPAP3⁵³⁵⁻⁶⁶⁵ (R1R2R3) complex was purified, as described⁵⁰, but in the presence of ADP and with replacement of the FlagTrap by a Hydrophobic interaction column (HIC), followed by the Superose 6 column. Peak fractions collected from the HisTrap were incubated with 5 mM CaCl₂ during 1 h and loaded onto an HiPrepTM Octyl FF 16/10 column (GE Healthcare) equilibrated in Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.5 mM TCEP, 300 μ M ADP). Bound proteins were eluted using Buffer D (Buffer C without CaCl₂, supplemented with 5 mM EDTA). To remove the FLAG_FH8 tag the collected samples were incubated 18 h at 4 °C with 1% (w/w) HRV-3C protease (Thermo Fisher Scientific). To separate oligomeric species, we used a Superose 6 column equilibrated in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM TCEP and 400 μ M ADP. Elution resulted in a single peak containing a stable R1/R2 hexameric complex bound to RPAP3-Cter (Fig. 2f). The peak fractions were pooled and concentrated to 12.5 mg/ml using a 10 kDa Cut-off Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore). All purification steps were carried out at room temperature and were monitored by NuPage Bis-Tris gels (Invitrogen, NP0302).

Purification of RPAP3⁵³⁵⁻⁶⁶⁵ and NMR sample preparation. Recombinant ¹³C/¹⁵N-labeled RPAP3⁵³⁵⁻⁶⁶⁵ domain with a cleavable 6 \times His-tag were overexpressed in *E. coli* (DE3) pRARE2 (Novagen) overnight at 20 °C in a minimal M9 medium complemented with ¹⁵N-NH₄Cl and ¹³C-d6-Glucose and purified on TALON beads (Clontech) in 25 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl and eluted from the resin by cleavage with the HRV-3C protease (GE Healthcare). A final size exclusion chromatography (S75, GE Healthcare) performed in 10 mM NaPi, pH 6.4, 150 mM NaCl, and 0.5 mM TCEP provided ¹⁵N/¹³C-labeled samples at a concentration of 1 mM after concentration with Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (Millipore).

Fig. 7 The R2SP complex promotes the stabilization of its clients and the assembly of liprin- α 2 complexes. **a** R2SP enhances expression of some of its clients. The graph depicts the relative expression levels of the indicated FFL-fusion proteins in HeLa cells expressing PIH1D2, vs. parental HeLa cells not expressing it. Dark blue: experiment performed at 37 °C; light blue: experiment performed at 32 °C. Values are normalized by the mean of controls (left); error bars: standard deviation. ***p*-value < 0.02 with a *t*-test involving all the control samples (*n* >= 3). **b** Binding of PPFIA2-related proteins to SPAG1 and PIH1D2. The graph depicts LUMIER interaction assays between the indicated proteins. Error bars: standard deviation. Stars: values significantly greater than six-times the mean value obtained in the control IPs without anti-FLAG antibody (Ct). **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.001 (Z-test). **c** R2SP promotes association of liprin- α 2 (PPFIA2) with its partners. The graph depicts LUMIER interaction assays between PPFIA2 and its partners, in HeLa cells expressing or not PIH1D2. Legend as in Fig. 3c, with single black stars indicating a *p*-value < 0.05, and double black stars a *p*-value < 0.001 (Z-test comparing values of the FLAG IPs with six-times the mean value obtained in the control IP). Orange stars: comparison of HeLa and HeLa-PIH1D2 cells. Error bars: standard deviation. **p*-values < 0.05; ***p*-values < 0.005 (T-test). **d** Assembly of liprin- α 2 complexes by R2SP

NMR structure calculation. Classical 3D NMR spectra were recorded at 298 K on a 600 MHz AVANCE III spectrometer equipped with a cryoprobe. This permitted to obtain almost complete ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of RPAP3₅₃₅₋₆₆₅. Chemical shifts were referenced to DSS and derived into dihedral angle restraints with TALOS-N⁵². Automated procedure of CYANA 3.97⁵³ was then used to derive distance restraints from 2D ^1H - ^1H NOESY and 3D ^{15}N - and ^{13}C -NOESY-HSQC spectra, all recorded with a mixing time of 120 ms. The final sets of dihedral angle and inter-proton restraints were carefully checked and used to generate 100 CYANA structures, which were refined in explicit water using the AMBER-based Portal Server for NMR structures (AMPS-NMR;^{54,55}). The 20 structures with the lowest constraint energies were selected as the most representative. In the final set of structures, 94.3% and 5.7% of the residues lie respectively in the most favored and allowed regions of the Ramachandran plot. All 3D structures were drawn with Pymol⁵⁶.

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

Non-denaturing mass spectrometry analysis. For non-denaturing mass spectrometry analysis, samples were buffer exchanged against ammonium acetate (150 mM, pH 8.0) buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), using Zeba Spin desalting columns (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Sample concentrations were determined by UV absorbance using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, France). Mass spectrometry analyses were carried out on a hybrid electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Synapt G2 HDMS, Waters, Manchester, UK) coupled to an automated chip-based nanoelectrospray source (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, U.S.A.) operating in the positive ion mode. Mass spectrometer calibration was performed using singly charged ions produced by a 2 mg/ml solution of cesium iodide in 2-propanol/water (1v/1v) over the m/z range 1000–20,000. Instrumental parameters have been optimized to get optimal high m/z ion transmission without dissociation of weak non-covalent interactions by raising the backing pressure to 6 mbar and the cone voltage to 100 V. Data interpretation was performed using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

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

SILAC proteomics. SILAC experiments were performed as previously described⁷. HeLa cells were grown for 15 days in each isotopically labeled media (CIL/Eur-isotop), to ensure complete incorporation of isotopically labeled arginine and lysine (light label (K0R0, L) or semi-heavy label L-Lysine-²HCl (²H4, 96–98%)/L-Arginine-HCl (¹³C6, 99%) (K4R6, M) or L-Lysine-²HCl (¹³C6, 99%; ¹⁵N2, 99%)/L-Arginine-HCl (¹³C6, 99%; ¹⁵N4, 99%) heavy label (K8R10, H) (percentages

represent the isotopic purity of the labeled amino acids). Six 15-cm diameter plates were used per SILAC condition. Cells were rinsed with PBS, trypsinized and cryogrounded in lysis buffer (0.5% triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, protease inhibitor cocktail). Extracts were incubated 20 min at 4 °C and clarified by centrifugation for 10 min at 20,000 g. For all IP experiments, extracts were pre-cleared by incubation with Protein G Sepharose beads (GE healthcare) for 1 h at 4 °C. The control was extracted from the SILAC light condition prepared from H9 HeLa cells that did not express the GFP fusion. Each extract was then incubated with 50 μl of GFP-Trap beads (gta-20, Chromotek) for 75 min at 4 °C, washed five times with lysis buffer, and beads from the different isotopic conditions were finally pooled. Bound proteins were eluted by adding 1% SDS to the beads and boiling for 10 min.

Reduction and alkylation were performed on the eluate with DTT (BDH 443553B, 10 mM) for 2 min at 95 °C followed by iodoacetamide treatment (Sigma I1149, 50 mM) for 30 min in the dark. Proteins were separated by SDS/PAGE and in gel-digested with trypsin in 20 mM NH₄HCO₃ (Trypsin Gold, Promega V5280). Ten slices were cut, and extracted peptides were resuspended in 0.1% formic acid/2% acetonitrile solution before being analyzed by mass spectrometry. Peptides were analyzed by nano-flow liquid chromatography coupled to Fourier transform tandem mass spectrometry (nanoLC-FT-MS/MS) using a LTQ Velos Pro Orbitrap Elite mass spectrometer coupled to an Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were performed on-line on a Pepmap precolumn (0.3 mm 10 mm, Thermo Fisher Scientific) in buffer A (2% acetonitrile, 0.1% formic acid). A gradient consisting of 2–40% buffer B (B = 99.9% acetonitrile with 0.1% formic acid; 3–33 min) and 40–80% B (33–34 min) was used to separate peptides at 300 nL/min from a Pepmap capillary reversed-phase column (0.075 mm \times 150 mm, Thermo Fisher Scientific). Mass spectra were acquired using a top-20 collision-induced dissociation (CID) data-dependent acquisition (DDA) method. The Orbitrap was programmed to perform a FT 400–1,400 Th mass scan (60,000 resolution) with the top 20 ions in intensity selected for collision-induced dissociation (CID) data-dependent acquisition (DDA) MS/MS in the LTQ. FT spectra were internally calibrated using a single lock mass (445.1200 Th). Target ion numbers were 500,000 for FT full scan on the Orbitrap and 10,000 MSn on the LTQ. Data were acquired using the Xcalibur software v2.2. Protein identification and quantitation were performed using the program MaxQuant (version 1.5.2.8; <http://www.maxquant.org/>). Few parameters were not default: database: human reference proteome set (canonical isoforms downloaded from Expaty on May 29th 2017); enzyme specificity trypsin/P; variable modifications: methionine oxidation and protein N-Acetylation; Fixed modifications: Cysteine carbamidomethylation; MS/MS tolerance: 0.5 Da; False Discovery Rate (FDR): 1%. In addition to the FDR, proteins were considered to be identified if they had at least two peptides including one unique/Razor peptide and they were considered quantified if they had at least one quantified SILAC pairs. Proteins labeled as REV (non-real proteins from the reverse database) and CONT (contaminants) were automatically discarded, as well as proteins that did not show any SILAC M/L, H/L and H/M ratio. B Significance calculation were done with the software Perseus v1.4.2, as previously described⁵⁷ to highlight statistically significant protein ratios (p value < 0.05).

LUMIER assays. HEK293 cells were seeded in 24-well plates and transfected with 450 ng of the RL fusion and 50 ng of the 3xFLAG-FFL fusion, with 1 μl of JetPrime (PolyPlus), as recommended by the manufacturer. 48 h later, cells were extracted for 15 min at 4 °C in 450 μl of HNTG containing protease inhibitor cocktail (Roche), and spun down at 4 °C and at 20,000 $\times g$ for 15 min. The IP was performed in duplicated, by putting 100 μl of the extract in each of four wells in a 96-well plate, with two wells being coated with anti-FLAG antibody (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1 \times PBS; F1804 Sigma-Aldrich), and two control wells without antibodies. Plates were incubated for 3 h at 4 °C, and then washed 5 times with 300 μl of ice-cold HNTG, for 10 min at 4 °C for each wash. After the last wash, 10 μl of PBL buffer (Promega) was added in each well. To measure the input, 2 μl of extract and 8 μl of 1xPBL buffer was put in empty remaining wells. Plates were then incubated 5 min at room temperature, and FFL and RL luciferase activities were measured in IP and input wells, using the dual luciferase kit (Promega). Every transfection was performed at least twice as independent replicates. Co-IP efficiency was defined as the RL/FFL ratio in the pellet, divided by the RL/FFL ratio in the input. Unless otherwise stated, statistical significance was evaluated using Z-test assaying whether the co-IP efficiency in the anti-FLAG IP was more than 6 times higher than the mean values obtained in the control IP, done without antibodies. This threshold of 6 corresponds to the mean plus two standard deviations of the FLAG/control fold difference obtained with a set of 36 assays done with non-interacting proteins (see Supplementary Fig. 4A). It ensures that only specific interactions are identified. The image of Figs. 3c and 4c and Supplementary Figs. 2D, 4A, and 4B was created by the authors.

To coat the wells of the 96-well plates with M2 anti-FLAG antibodies, High-binding plates were used (Lumitrac, Greiner), and 70 μl of M2 antibody (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1 \times PBS; F1804 Sigma-Aldrich) was put in each well and incubated overnight at room temperature in the dark. The next day, wells were blocked with 300 μl of blocking buffer, for 1 hour at room temperature. IP control wells were treated the same way except that no antibody was put in the well. Blocking buffer was 3% BSA, 5% sucrose, 0.5% Tween 20, 1 \times PBS). HNTG buffer was 20 mM HEPES-KOH pH

7.9, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA. The values of LUMIER assays used in the bar plots are in Supplementary Data 3.

Luciferase assays. H9 HeLa cells were grown on 24-well plates and co-transfected with plasmids expressing a Flag-tagged Firefly luciferase (FFL) in fusion with the protein of interest, and with a plasmid coding Renilla luciferase as control (RL). After 48 h, cells were extracted in 100 µl of 1× PLB buffer (Promega) and incubated at 4 °C for 15 min. RL and FFL activities were measured on 96-well plates using 10 µl of cell extract and the dual-luciferase assay kit (Promega). Values obtained for FFL were normalized to RL values. Experiments were done at least in triplicate. The values used for the bar plot of Fig. 7a are in Supplementary Data 3.

Microscopy. HeLa cells expressing the GFP-fusion of interest were plated on glass coverslips, fixed one day later, and mounted in Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories). Cells were imaged using an upright epifluorescence microscope (Zeiss AxioImager Z1.) with a ×63 oil objective (NA 1.4). Images were captured with a sCMOS camera (Hamamatsu) and mounted in Photoshop.

Genomes and Sequence analyses. Sequences were retrieved from the NCBI annotated databases (nr and EST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using NCBI PHI-BLAST, as well as BLAST and Annotation search tools available in the Geneious 9.1.8 software package (Biomatters, <http://www.geneious.com/>). Amino acid sequences were aligned using MAFFT v7.017⁵⁸. Orthology was determined by reciprocal BLAST analysis and domain architecture. The accession numbers used for Fig. 1c and Supplementary 3C are listed in Supplementary Data 4.

Pairwise yeast two-hybrid assays. Plasmids pACT2 and pAS2ΔΔ were introduced into haploid *Saccharomyces cerevisiae* strains (Y187 and CG1945, respectively)⁵⁹. Strains were crossed and diploids were selected on –Leu–Trp selective media and then plated on triple selective media (–Leu–Trp–His). Growth was assessed visually after 3 days at 30 °C. The strength of interactions was evaluated by comparing the number of clones growing on –Leu–Trp (selection of diploids) and –Leu–Trp–His plates (selection for interaction).

Yeast two-hybrid screens. Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics Services, S.A.S., Paris, France (<http://www.hybrigenics-services.com>). The coding sequence for full-length (1–315) PIH1D2 (NCBI reference NM_138789) was PCR-amplified (Supplementary Table 1) and cloned into pB27 plasmid, which derives from pBTM116⁶⁰. PIH1D1 was fused at the C-terminal end of LexA (LexA-PIH1D2). Bait sequence integrity was checked by sequencing. Two random-primed cDNA library were constructed in derivative of the P6 plasmid pGADGH⁶¹, and were used for the screens. The first was made from human testis cDNAs, and the second one with cDNAs made from three human lung cancer cell lines: A549, H1703, and H460.

As many as 31 and 51 million clones were screened for the human testis and the human lung cancer library, respectively. This represents 3-fold and 5-fold the complexity of the respective libraries. A mating strategy was used for the screens, using on one side L40ΔGal4 (Mata) yeast strains transformed with the bait, and on the other side the strain YHG13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, Mata) containing the library, as previously described⁵⁹. For the testis, screen, 182 His+ colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine, while for the lung cancer library, 345 His+ colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine and supplemented with 50 mM 3-aminotriazole to retain an optimal selectivity. Between 2 and 10 million diploid were tested. The 5' and 3' junctions of the prey insert were analyzed by capillary sequencing after yeast lysis and PCR amplification. The resulting sequences were compared to Human GenBank (NCBI) for prey identification.

A statistical analysis of the results has been conducted to define a confidence score (PBS, for Predicted Biological Score), as previously described⁶². First, the number of independent prey, the localization of the prey fusion, and the reading frames were taken into account to define the local score. Second, a global connectivity study using all the screens conducted at Hybrigenics using the same libraries was applied. This second analysis identify False positive (Score F), and highly connected preys (score E). The other score defines a probability for an interaction to be identify by chance, and are divided in four categories, from A (highest confidence) to D (lowest confidence). The PBS scores have been shown to positively correlate with the biological significance of interactions^{63,64}.

Quantification and statistical analysis. Statistical tests were done with Excel.

Data availability. Data supporting the findings of this manuscript are available from the corresponding authors upon reasonable request. 3D coordinates and NMR chemical shifts of RPAP3₅₃₅₋₆₆₅ were deposited in the Protein Data Bank and in the Biological Magnetic Resonance Data Bank under respective entry codes 6EZ4 and 34200. The SILAC data are accessible in the ProteomeXchange Database with the following accession numbers: RPAP3-Cter and mutants (PXD009518), PIH1D2 (PXD009520), PIH1D3 (PXD009499), DNAAF2 (PXD009501), CCDC103 (PXD009498).

Received: 25 November 2017 Accepted: 19 April 2018
Published online: 29 May 2018

References

- Zhao, R. et al. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**, 715–727 (2005).
- Houry, W. A., Bertrand, E. & Coulombe, B. The PAQosome, an R2TP-based chaperone for quaternary structure formation. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 4–9 (2018).
- Boulon, S. et al. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* **180**, 579–595 (2008).
- Bizarro, J. et al. NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8973–8989 (2015).
- Cloutier, P. et al. High-resolution mapping of the protein interaction network for the human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-associated complexes. *Methods* **48**, 381–386 (2009).
- Malinova, A. et al. Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* **216**, 1579–1596 (2017).
- Boulon, S. et al. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **39**, 912–924 (2010).
- Cloutier, P. & Coulombe, B. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol.* **88**, 211–221 (2010).
- Jeronimo, C. et al. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol. Cell* **27**, 262–274 (2007).
- Horejsi, Z. et al. CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell* **39**, 839–850 (2010).
- Takai, H., Xie, Y., de Lange, T. & Pavletich, N. P. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev.* **24**, 2019–2030 (2010).
- Boulon, S., Bertrand, E. & Pradet-Balade, B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biol.* **9**, 148–154 (2012).
- von Morgen, P. et al. MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex. *Oncogene* **36**, 4943–4950 (2017).
- Horejsi, Z. et al. Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell Rep.* **7**, 19–26 (2014).
- Pal M. et al. Structural basis for phosphorylation-dependent recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure* **22**, 805–818 (2014).
- Zhou, C. Y. et al. Regulation of Rvb1/Rvb2 by a domain within the INO80 chromatin remodeling complex implicates the yeast rvbs as protein assembly chaperones. *Cell Rep.* **19**, 2033–2044 (2017).
- Bizarro, J. et al. Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J. Cell Biol.* **207**, 463–480 (2014).
- Matias, P. M., Gorynia, S., Donner, P. & Carrondo, M. A. Crystal structure of the human AAA+protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.* **281**, 38918–38929 (2006).
- Ewens, C. A. et al. Architecture and nucleotide-dependent conformational changes of the Rvb1-Rvb2 AAA+complex revealed by cryoelectron microscopy. *Structure* **24**, 657–666 (2016).
- Lakomek, K., Stoehr, G., Tosi, A., Schmailzl, M. & Hopfner, K. P. Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ATPases Rvb1, Rvb2. *Structure* **23**, 483–495 (2015).
- Cloutier, P. et al. R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat. Commun.* **8**, 15615 (2017).
- McKeegan, K. S., Debieux, C. M. & Watkins, N. J. Evidence that the AAA+proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol. Cell Biol.* **29**, 4971–4981 (2009).
- Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N. & Meier, U. T. Mechanism of the AAA+ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA* **18**, 1833–1845 (2012).
- Quinternet, M. et al. Structure/function analysis of protein-protein interactions developed by the yeast Pih1 platform protein and its partners in box C/D snoRNP assembly. *J. Mol. Biol.* **427**, 2816–2839 (2015).
- Back, R. et al. High-resolution structural analysis shows how Tah1 tethers Hsp90 to the R2TP complex. *Structure* **21**, 1834–1847 (2013).
- Rivera-Calzada A. et al. The structure of the R2TP complex defines a platform for recruiting diverse client proteins to the HSP90 molecular chaperone system. *Structure* **25**, 1145–1152 (2017).

27. Tian, S. et al. Pih1p-Tah1p Puts a lid on hexameric AAA+ATPases Rvb1/2p. *Structure* **25**, 1519–1529 (2017). e1514.
28. Paci, A. et al. The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *J. Biol. Chem.* **287**, 43205–43214 (2012).
29. Tarkar, A. et al. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.* **45**, 995–1003 (2013).
30. Yamamoto, R., Hirono, M. & Kamiya, R. Discrete PIH proteins function in the cytoplasmic preassembly of different subsets of axonemal dyneins. *J. Cell. Biol.* **190**, 65–71 (2010).
31. Quinternet, M., Starck, J. P., Delsuc, M. A. & Kieffer, B. Unraveling complex small-molecule binding mechanisms by using simple NMR spectroscopy. *Chemistry* **18**, 3969–3974 (2012).
32. Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M. & Kube, S. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 2–14 (2012).
33. Yoshida, M. et al. RPAP3 splicing variant isoform 1 interacts with PIH1D1 to compose R2TP complex for cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 320–324 (2013).
34. Schopf, F. H., Biebl, M. M. & Buchner, J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 345–360 (2017).
35. Thul P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, eaal3321 (2017).
36. Olcese, C. et al. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat. Commun.* **8**, 14279 (2017).
37. Stryker, E. & Johnson, K. G. L. A. R. liprin alpha and the regulation of active zone morphogenesis. *J. Cell. Sci.* **120**, 3723–3728 (2007).
38. Chia, P. H., Patel, M. R., Wagner, O. I., Klopfenstein, D. R. & Shen, K. Intramolecular regulation of presynaptic scaffold protein SYD-2/liprin-alpha. *Mol. Cell. Neurosci.* **56**, 76–84 (2013).
39. Wei, Z. et al. Liprin-mediated large signaling complex organization revealed by the liprin-alpha/CASK and liprin-alpha/liprin-beta complex structures. *Mol. Cell* **43**, 586–598 (2011).
40. Zhao, R. & Houry, W. A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell. Biol.* **83**, 703–710 (2005).
41. Benbahouche Nel, H. et al. Drosophila Spag is the homolog of RNA polymerase II-associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *J. Biol. Chem.* **289**, 6236–6247 (2014).
42. Roe, S. M. et al. The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* **116**, 87–98 (2004).
43. Omran, H. et al. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* **456**, 611–616 (2008).
44. Torres V. I., Inestrosa N. C. Vertebrate presynaptic active zone assembly: a role accomplished by diverse molecular and cellular mechanisms. *Mol. Neurobiol.* **55**, 4513–4528 (2017).
45. Joshi, C. S., Khan, S. A. & Khole, V. V. Regulation of acrosome reaction by Liprinalpha3, LAR and its ligands in mouse spermatozoa. *Andrology* **2**, 165–174 (2014).
46. Joshi, C. S., Suryawanshi, A. R., Khan, S. A., Balasinar, N. H. & Khole, V. V. Liprinalpha3: a putative estrogen regulated acrosomal protein. *Histochem. Cell. Biol.* **139**, 535–548 (2013).
47. Tantale K. et al. A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat. Commun.* **7**, 12248 (2016).
48. Hallais, M. et al. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1358–1366 (2013).
49. Diebold M. L., Fribourg S., Koch M., Metzger T., Romier C. Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer. *J. Struct. Biol.* **175**, 178–188 (2011).
50. Gorynia, S., Matias, P. M., Bandejas, T. M., Donner, P. & Carrondo, M. A. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. *Acta Crystallogr.* **64**, 840–846 (2008).
51. Costa, S. J. et al. The Fh8 tag: a fusion partner for simple and cost-effective protein purification in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **92**, 163–170 (2013).
52. Shen, Y. & Bax, A. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. *J. Biomol. NMR* **56**, 227–241 (2013).
53. Lopez-Mendez, B. & Guntert, P. Automated protein structure determination from NMR spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13112–13122 (2006).
54. Bertini, I., Case, D. A., Ferella, L., Giachetti, A. & Rosato, A. A Grid-enabled web portal for NMR structure refinement with AMBER. *Bioinformatics* **27**, 2384–2390 (2011).
55. Casey, J. P. et al. A case report of primary ciliary dyskinesia, laterality defects and developmental delay caused by the co-existence of a single gene and chromosome disorder. *BMC Med. Genet.* **16**, 45 (2015).
56. The PyMOL Molecular Graphics System, V.1.8 (Schrödinger Inc., 2015).
57. Cox, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteom.* **13**, 2513–2526 (2014).
58. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059–3066 (2002).
59. Fromont-Racine, M., Rain, J. C. & Legrain, P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* **16**, 277–282 (1997).
60. Vojtek, A. B. & Hollenberg, S. M. Ras–Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* **255**, 331–342 (1995).
61. Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. & Fields, S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920–924 (1993).
62. Formstecher, E. et al. Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res.* **15**, 376–384 (2005).
63. Rain, J. C. et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**, 211–215 (2001).
64. Wojcik, J., Boneca, I. G. & Legrain, P. Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J. Mol. Biol.* **323**, 763–770 (2002).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer, INCA PLBio 2016-161 and ANR-16-CE11-0032-04 to E.B., and from the French Proteomic Infrastructure (ProFI; ANR-10-INBS-08-03) to S.C. The work was also supported by GIS IBI&A and Région Alsace, by portuguese national funds through FCT–Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (project PTDC/BBB-BEP/1463/2014), and by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement. iNOVA4Health - UID/Multi/04462/2013, a program financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia/Ministério da Educação e Ciência, through national funds and co-funded by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement is acknowledged. P.E.S. was supported by fellowship SFRH/BD/111603/2015. C.M. and C.A. were supported by fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer; M.B. was supported by a fellowship from the Région Alsace; Daniel Schwarz is acknowledged for his input on the SPR experiments, and P. Barbry for helpful discussions.

Author contributions

C.M., M.Q., B.B., M.E.C., M.C.R., A.C.F.P., P.Fa., X.M., P.E.S., P.M.F.S., E.B., C.A., Y.A., M.B., and C.V. performed the experiments. F.V. performed mass spectrometry and statistics. J.C.R. performed yeast two-hybrid screens. P.Fo. performed the evolutionary studies. M.Q., X.M., B.C., T.M.B., C.V., S.C., B.P.B., E.B. supervised the work; M.Q., X.M., P.Fo., M.B., P.S., and E.B. prepared the Figures. M.Q., X.M., B.C., C.V., B.P.B., and E.B. conceived the study; M.Q., X.M., C.V., B.P.B., and E.B. wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04431-1>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



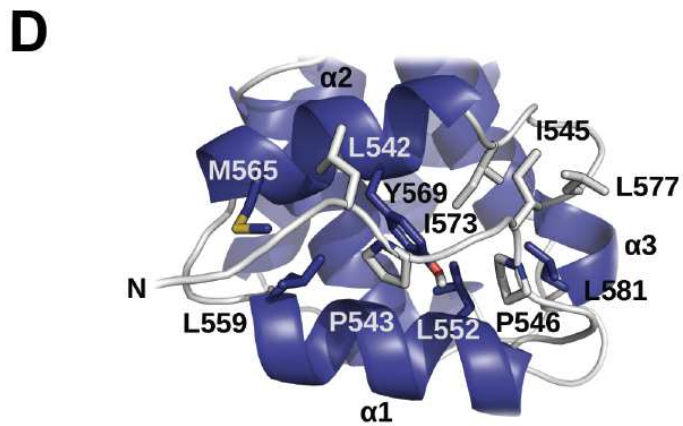
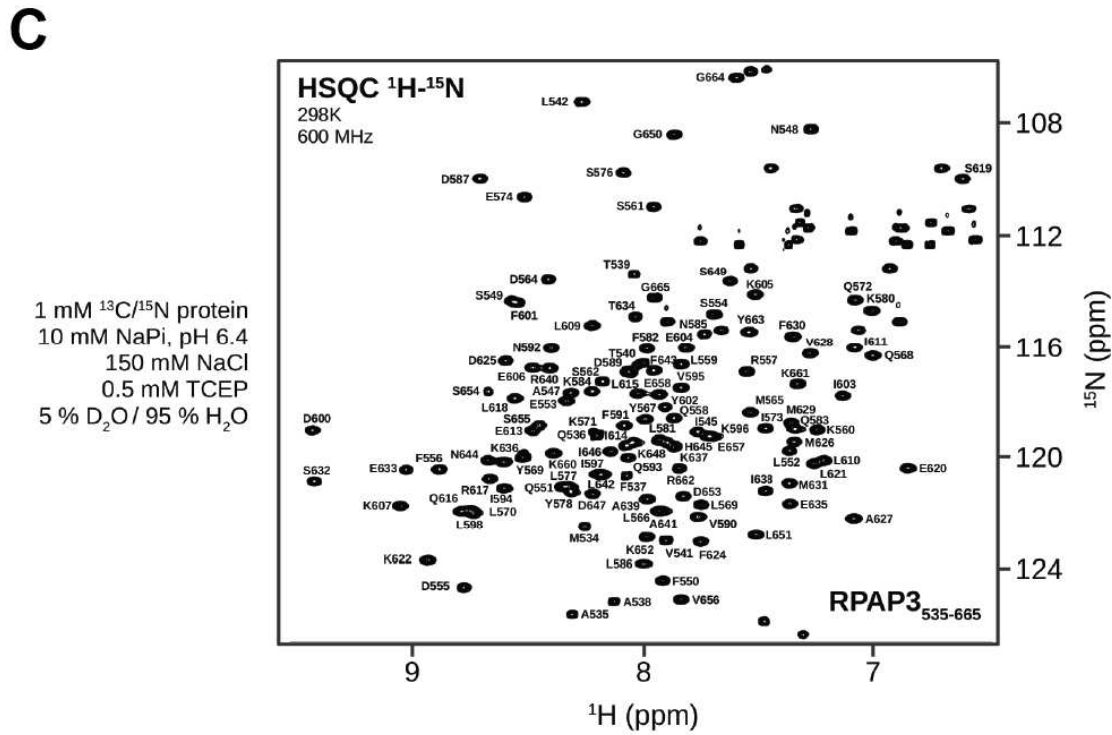
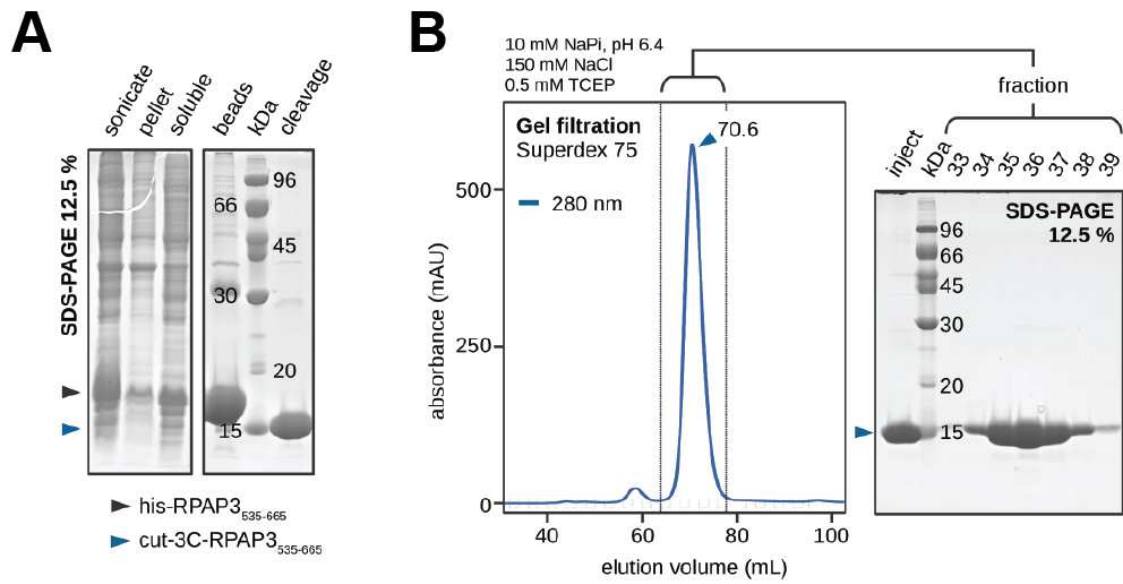
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Supplemental Figures and Table for

**The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like
quaternary chaperones**

Chloé Maurizy *et al.*



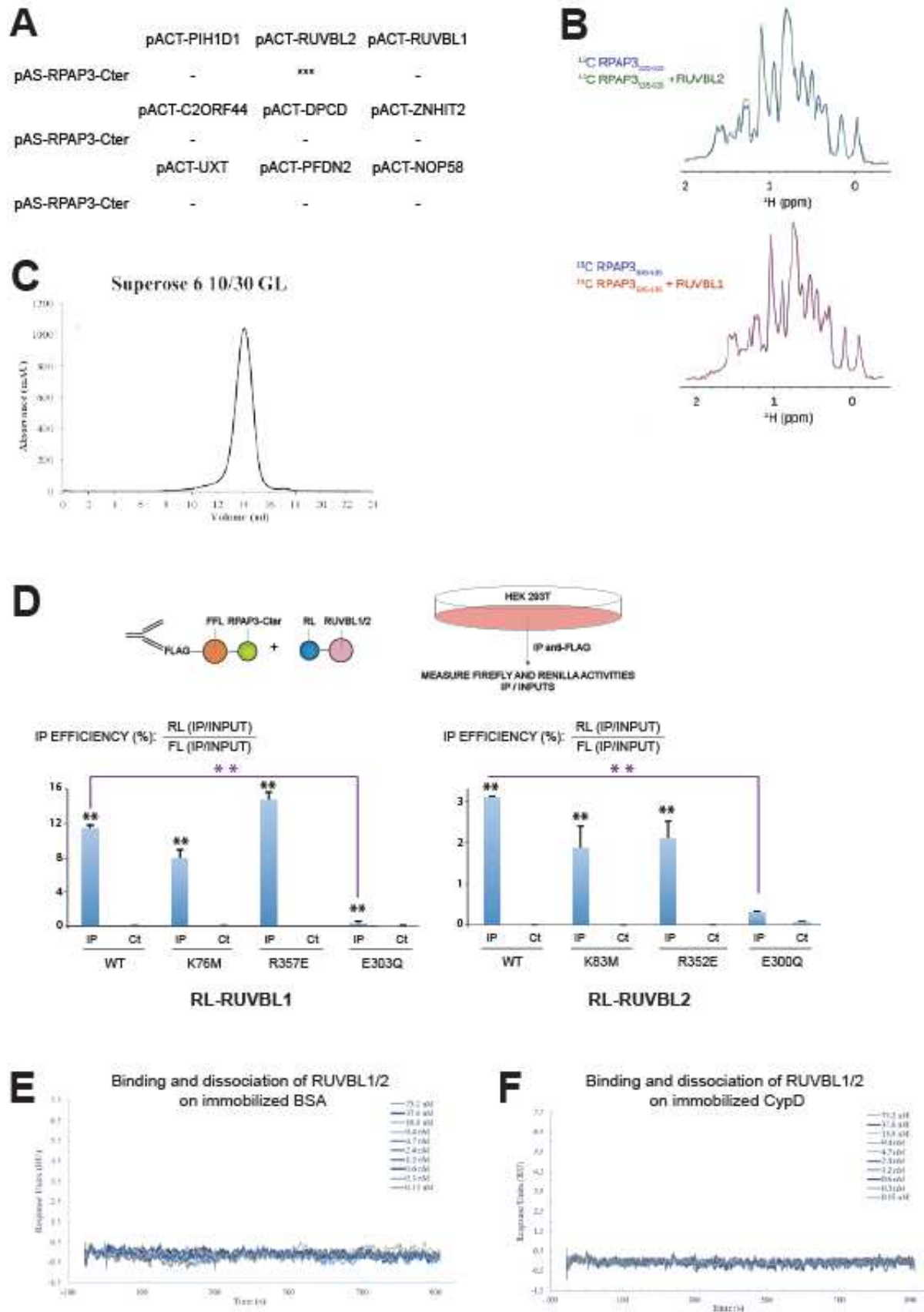
Supplementary Figure 1: Purification of RPAP3-Cter.

A-Purification of bacterially produced RPAP3-Cter. Left panel: Coomassie-stained gel loaded with extracts of bacteria overexpressing His-tagged RPAP3-Cter (fragment 535-665 of human RPAP3 isoform 1). Right panel: beads, molecular weight marker, and eluate of the beads digested with 3C protease. Arrows indicate the size of the tagged and untagged RPAP3-Cter.

B-Gel filtration profile of RPAP3-Cter eluted from beads (left), and Coomassie-stained gels of the various gel-filtration fractions (right).

C-HSQC ^1H - ^{15}N NMR spectrum of RPAP3-Cter, with the assignment of the signals.

D-Highlights of the interaction of the N-terminal loop that folds back on the helix bundle (ribbon representation). The side chains of the residues involved are labeled.



Supplementary Figure 2: RPAP3-Cter directly binds RUVBL1/2 hexamers.

A-Yeast two-hybrid analysis of putative RPAP3-Cter partners. Yeast strains expressing a Gal4-DBD-RPAP3-Cter fusion (pAS-RPAP3-Cter) were crossed with strains expressing the indicated proteins fused to Gal4 activation domain (pACT). "****" denotes a positive interaction (growth on selective media), while "-" denotes an absence of interaction.

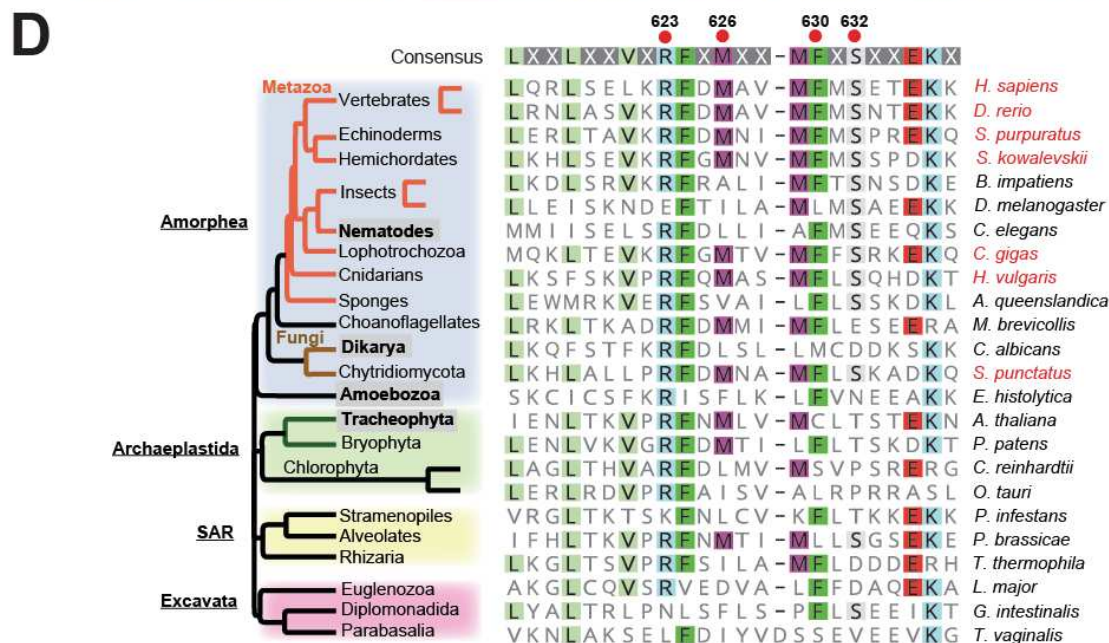
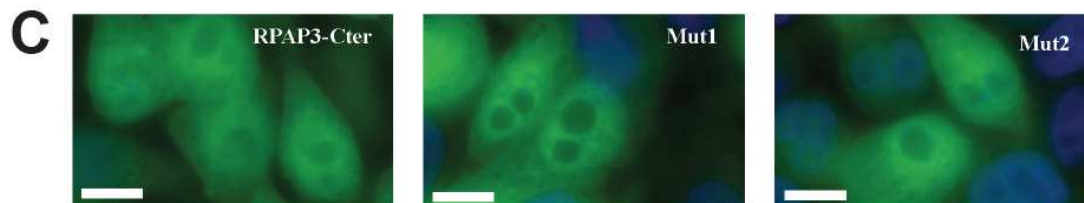
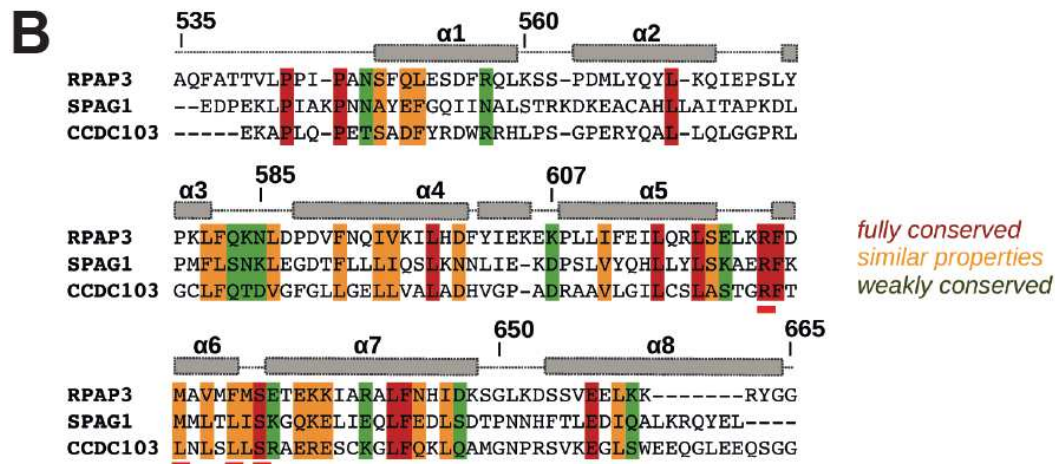
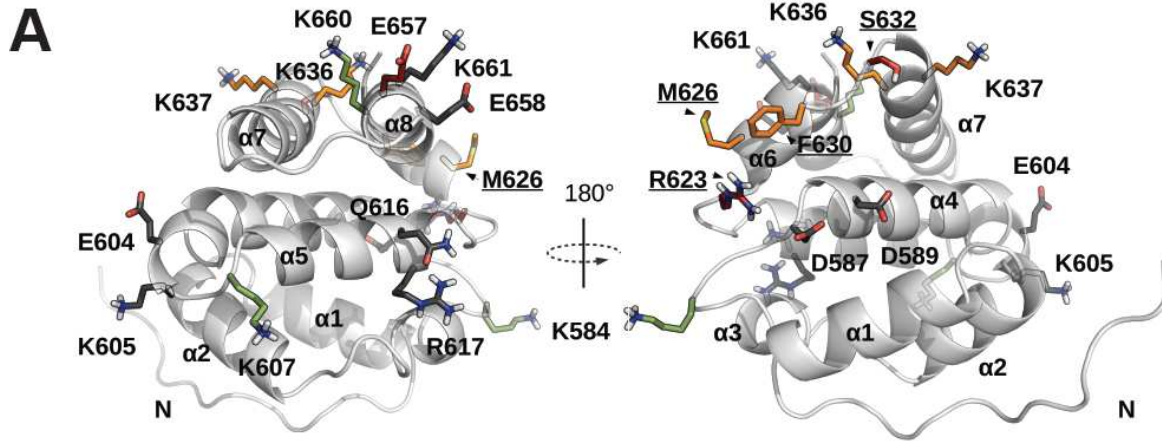
B-1D METHYL-SOFAST-HMQC NMR spectra in the methyl region of ¹³C-labeled RPAP3-Cter alone (blue line), or mixed with recombinant RUVBL1 (red line, top panel), or RUVBL2 (green line, bottom panel). Legend as in Figure 2C.

C-*In vitro* SPR binding assays of BSA (Bovine Serum Albumine) with RUVBL1/2. The graph depicts the response upon RUVBL1/2 injection (t=0s), or upon washing (t=300s), on immobilized BSA surfaces. X-axis: time (s); y-axis: response (arbitrary units).

D-LUMIER assay showing the *in vivo* interaction between RPAP3-Cter and RUVBL proteins. Legend as in 3C. **: p-value<0.001 (Z-test).

E-In vitro SPR binding assays of BSA with RUVBL1/2, without added nucleotide. The graph depicts the response of RUVBL1/2 injection (t=0s), or washing (t=300s), on immobilized BSA molecules. X-axis: time (s); y-axis: response (arbitrary units).

F-Legend as in E except that human His-tagged Cyclophilin D (CYPD) was immobilized on the surface of chip.



Supplementary Figure 3. Characterization of RPAP3-Cter mutants that do not bind RUVBL1/2.

A-3D structure of RPAP3-Cter, with the number and position of the mutated surface residues.

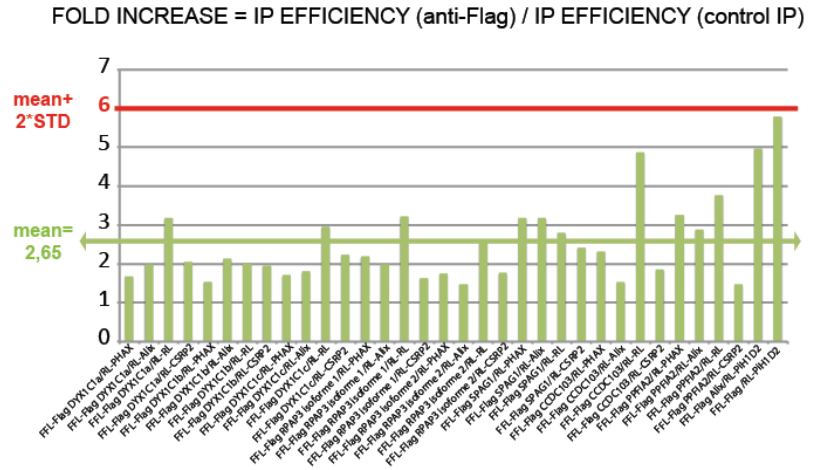
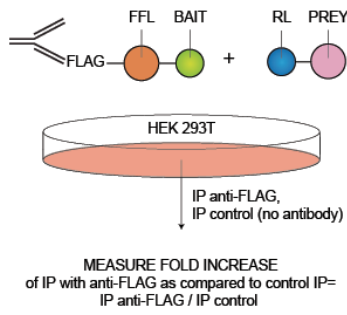
B-Alignment of RPAP3-Cter with the two other human proteins bearing a similar domain (SPAG1 and CCDC103). Underlined in red: the RPAP3-Cter amino-acids required for the interaction with RUVBL1/2.

C-Intracellular localization of wild-type and mutant RPAP3-Cter protein. Panels are micrographs of HeLa cells expressing the indicated protein fused to GFP. Green: GFP fluorescence; blue: DAPI signals. Scale bar: 10 microns.

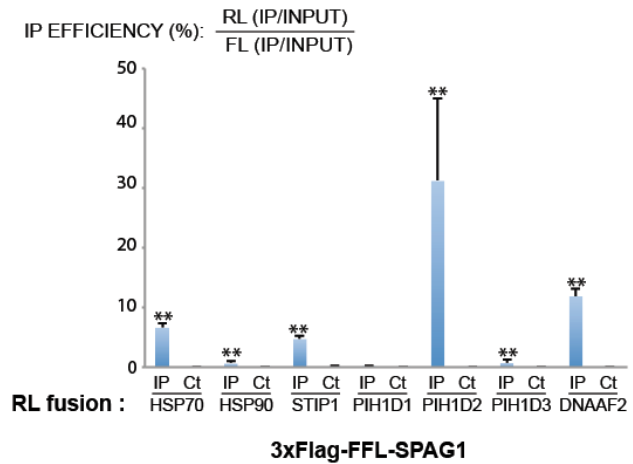
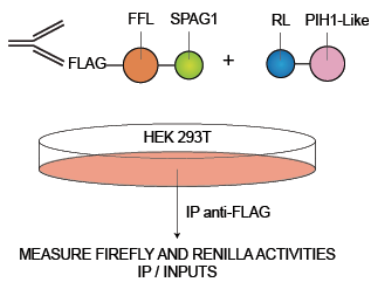
D- Conservation of the residues of RPAP3-Cter critical for RUVBL1/2 binding.

RPAP3 sequences from the indicated species were aligned and the portion corresponding to the human 615-637 amino acids are shown. The residues critical to RUVBL1/2 binding, i.e. R623, M626, F630 and S632 are figured by a red dot. Species in red indicate full conservation of the four amino acids.

A



B

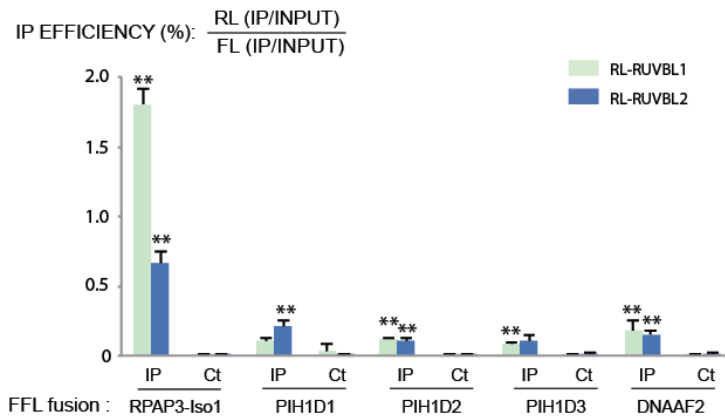


C

Fold enrichment over control (pValue)

	DYX1C1-iso-a	DYX1C1-iso-b	DYX1C1-iso-c	RPAP3-iso-1	RPAP3-iso-2	SPAG1	CCDC103
HSP70	34 (3.10 ⁻³)	9 (0.2)	49 (4.10 ⁻²⁷)	114 (9.10 ⁻⁶)	70 (2.10 ⁻²)	223 (2.10 ⁻⁸¹)	37 (2.10 ⁻²)
HSP90	58 (1.10 ⁻¹⁵⁰)	18 (3.10 ⁻³⁹)	51 (6.10 ⁻³)	61 (2.10 ⁻¹¹)	29 (5.10 ⁻⁴)	103 (1.10 ⁻³)	42 (1.10 ⁻²⁵)
STIP1	164 (4.10 ⁻⁶)	94 (2.10 ⁻³)	146 (5.10 ⁻¹⁴)	249 (3.10 ⁻³)	131 (5.10 ⁻³)	212 (6.10 ⁻⁸⁵)	196 (2.10 ⁻²)
PIH1D1	2 (1)	2 (1)	5 (1)	2232 (7.10 ⁻⁴)	26 (3.10 ⁻³)	7 (0.5)	3 (1)
PIH1D2	2 (1)	2 (1)	5 (0.8)	5 (0.8)	12 (4.10 ⁻²)	935 (3.10 ⁻⁶)	3 (1)
PIH1D3	45 (1.10 ⁻⁴⁴)	10 (2.10 ⁻⁴)	78 (3.10 ⁻³)	13 (2.10 ⁻⁸)	10 (6.10 ⁻²)	12 (5.10 ⁻³)	9 (7.10 ⁻²)
DNAAF2	2910 (1.10 ⁻⁴)	49 (2.10 ⁻¹⁰)	18 (5.10 ⁻⁴)	38 (5.10 ⁻¹⁰)	96 (3.10 ⁻¹¹)	651 (9.10 ⁻⁴)	10 (0.1)

D



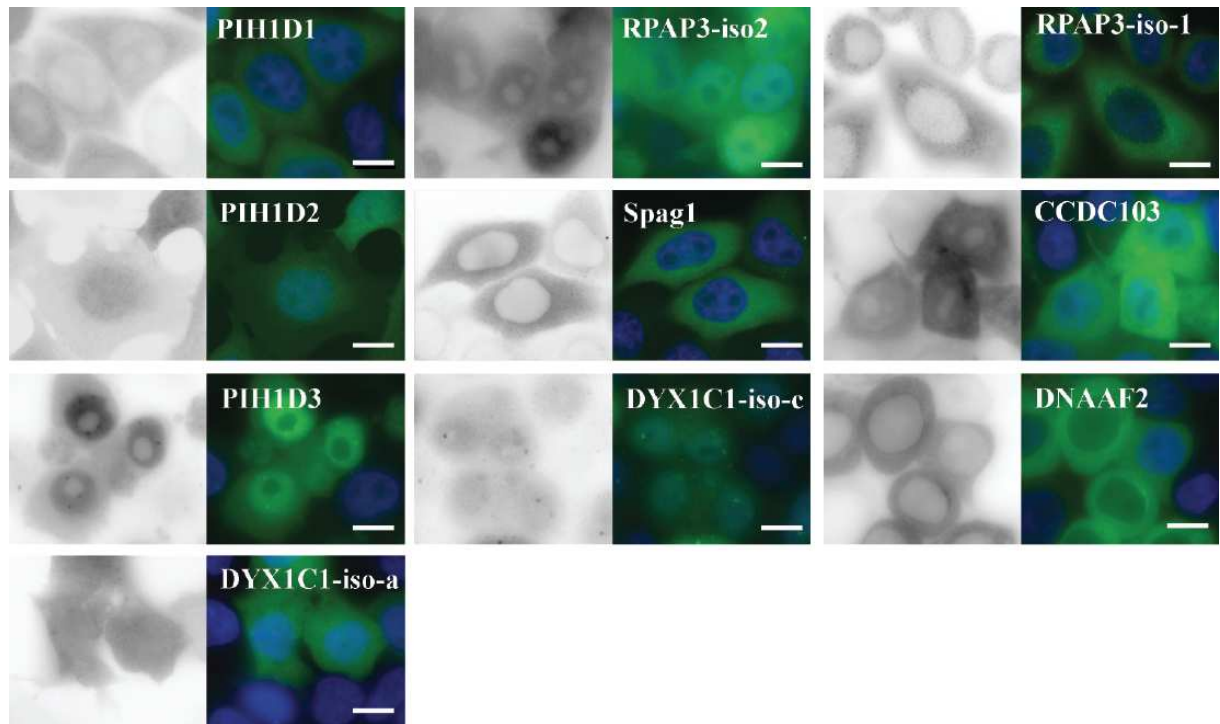
Supplementary Figure 4. Interaction of RPAP3-like and PIH-like proteins.

A-Control LUMIER assay with Alix, FFL, PHAX and CSRP2. The graph depicts fold enrichment of the FLAG IP vs the control IP ($RL[IP\ FLAG] / RL[IP\ Ct]$), for a series of control assays.

B-LUMIER interaction assay of SPAG1 with chaperones and PIH-like proteins. Legend as in Figure 3C.

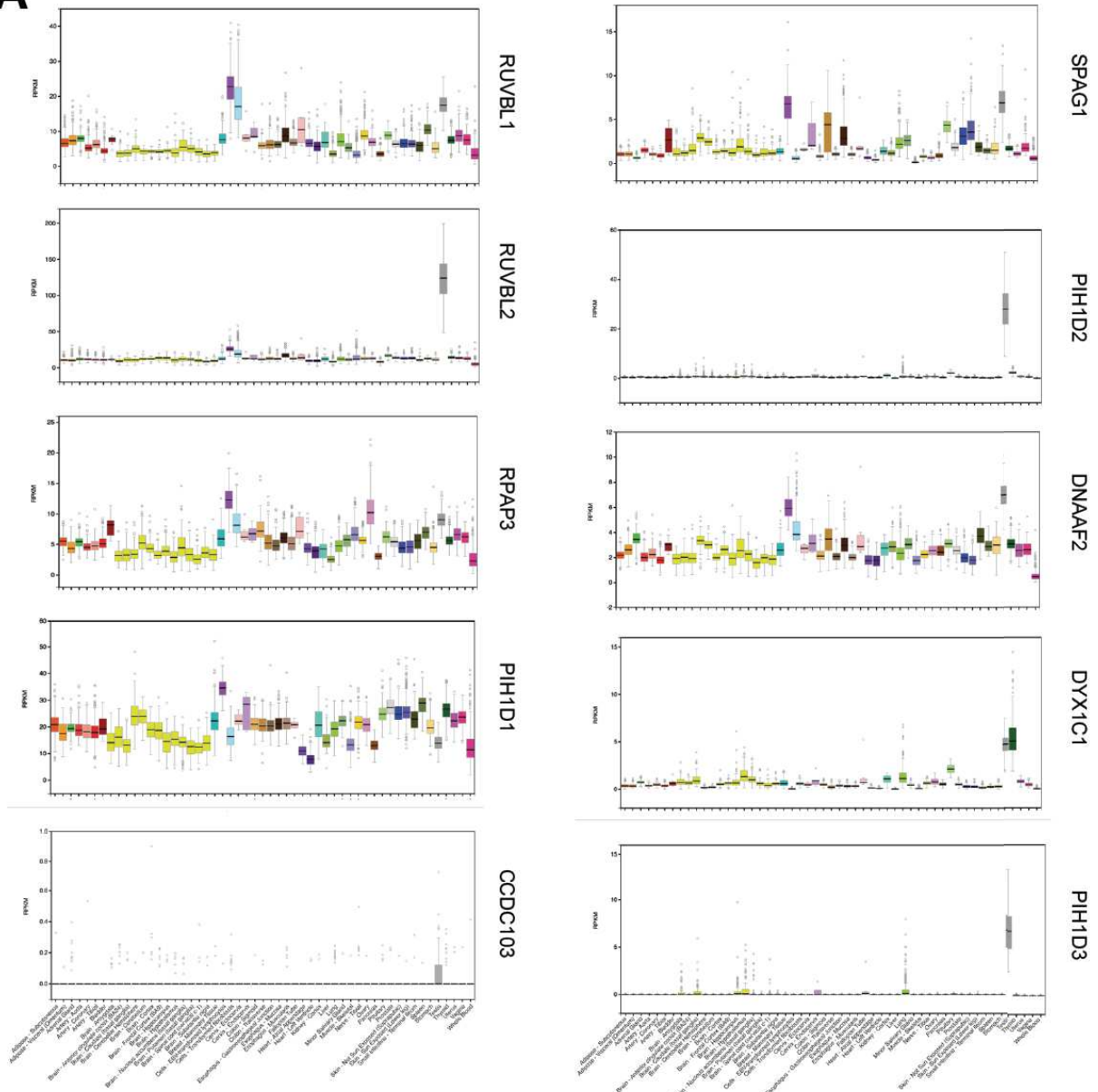
C-Summary of pairwise LUMIER interaction assays performed with the indicated proteins. The values are fold enrichment of a FLAG IP over a control IP done in absence of antibodies ($RL[IP\ FLAG] / RL[IP\ Ct]$). In parenthesis: pValues calculated with Z-test assaying whether the RL signal in the anti-FLAG IP is more than 6 times higher than in mean of the corresponding control IP done without antibodies.

D-LUMIER interaction assays of PIH-like proteins with RUVBL1 and RUVBL2. Legend as in Figure 3C. **: p-value<0.001 (Z-test).

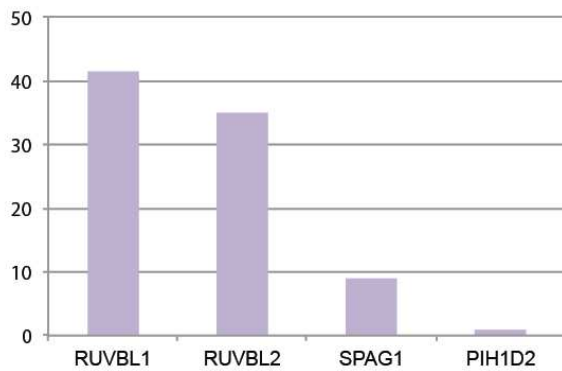


Supplementary Figure 5: Localization of RPAP3-like and PIH-like proteins.

Panels are micrographs of HeLa cells expressing the indicated protein fused to GFP. Green and black (left panels): GFP fluorescence; blue: DAPI signals. Scale bar: 10 microns.

A**B**

mRNA expression in HeLa cells
[normalized read counts]



Supplementary Figure 6: Tissue-specific expression of R2TP, RPAP3-like and PIH-like proteins.

A-Graphs displaying the mRNA expression levels (RPKM) of the RPAP3-like and PIH1-like proteins in various human organs. Data are from GTex portal (<https://gtexportal.org/home/>).

B-Graph displaying the expression levels of mRNAs encoding R2SP proteins in HeLa cells (normalized read counts).

Supplementary Table 1: primer sequences

	RPAP3-Cter (NMR)
Oligonucleotide forward	GGATATCCATATGGCTCAGTTTGCCACAACCTGTT
Oligonucleotide reverse	GGGGATCCTTAACCACCGTATCTTTTCTTGAGTTC
	RPAP3-Cter (Gateway)
Oligonucleotide forward	GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T CCATGCAGTTTGCCACAACCTGTTCTTC
Oligonucleotide reverse	GGGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTA ACCACCGTATCTTTTCTTGAG
	RPAP3-Cter mut1 (R623A-M626A) (IP SILAC)
Oligonucleotide forward	GACTTTCTGAACTAAAA GCG TTTGAT GCG GCAGTGATGTTTATG
Oligonucleotide reverse	CATAAACATCACTGCCGCATCAAACGCTTTTAGTTTCAGAAAGTC
	RPAP3-Cter mut2 (F630A-S632A) (IP SILAC)
Oligonucleotide forward	GTTTGATATGGCAGTGATG GCT ATG GCA GAAACAGAGAAAAAG
Oligonucleotide reverse	CTTTTTCTCTGTTTCTGCCATAGCCATCACTGCCATATCAAAC
	PIH1D2 (2H screen)
Oligonucleotide forward	TGGAATTCGGGGCCGGACGGCCTGGAGACATCCTCAAAGGTCTGC
Oligonucleotide reverse	AGGTCGAGGGGCCCCAGTGGCCTCACACCAAAGGCATTGTGATGATTAGC
	RPAP3-Cter mutants (K584A-D589A) (2H screen)
Oligonucleotide forward	GTTGTTTCAG GCA AATCTG GCT CCA GCT GTATTCAACCAGATCG
Oligonucleotide reverse	CGATCTGGTTGAATACAGCTGGAGCCAGATTTGCCTGAAACAAC
	RPAP3-Cter mutants (E604A-K605A) (2H screen)
Oligonucleotide forward	GACTTTTACATT GCG GCA GAA GCG CCATTA CTATCTTTG
Oligonucleotide reverse	CAAAGATGAGTAATGGCGCTTCTGCCGCAATGTAAAAGTC
	RPAP3-Cter mutants (Q616A-R617A) (2H screen)
Oligonucleotide forward	CTCATCTTTGAAATCTTA GCA GCA CTTTCTGAACTAAAAAG
Oligonucleotide reverse	CTTTTTAGTTTCAGAAAGTGCTGCTAAGATTTCAAAGATGAG
	RPAP3-Cter mutants (K636A-K637A) (2H screen)
Oligonucleotide forward	GTTTATGTCAGAAACAGAG GCA GCG ATTGCACGTG
Oligonucleotide reverse	CACGTGCAATCGCTGCCTCTGTTTCTGACATAAAC
	RPAP3-Cter mutants (E657A-E658A-K660A-K661A) (2H screen)
Oligonucleotide forward	GAAGGATAGTTCTGTGCGCAGCACTCGCGCAAGATACGGTGGTTGAGCCATCCAG
Oligonucleotide reverse	CTGGATGGCTCAACCACCGTATCTTGCCGCGAGTGCTGCGACAGAACTATCCTTC

ARTICLE 4 :The HSP90/R2TP assembly chaperone promotes cell proliferation in the intestinal epithelium

Chloé Maurizy^{1,2}, Claire Abeza^{1,2,8,%}, Bénédicte Lemmers^{1,%}, Monica Gabola¹, Ciro Longobardi¹, Valérie Pinet¹, Marina Ferrand¹, Conception Paul¹, Julie Bremond¹, Francina Langa³, François Gerbe^{4,5}, Philippe Jay^{4,5}, Céline Verheggen^{1,2,8}, Nicola Tinari⁶, Dominique Helmlinger⁷, Rossano Lattanzio⁶, Edouard Bertrand^{1,2,8,\$}, Michael Hahne^{1,\$}, Béréngère Pradet-Balade^{2,7,\$,*}

¹ IGMM, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

² Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer

³ Centre d'Ingénierie Génétique Murine, Institut Pasteur, Paris

⁴ IGF, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

⁵ Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer

⁶ Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, Center for Advanced Studies and Technology (CAST), 'G. d'Annunzio' University of Chieti–Pescara, Chieti, Italy.

⁷ CRBM, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

⁸ IGH, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

^{,\$} equal contributions

* Correspondence should be addressed to B.P.B. (email: pradet@crbm.cnrs.fr)

Résumé

Le rôle du R2TP dans l'homéostasie des tissus n'avait encore jamais été étudié. Une étudiante en thèse du laboratoire Chloé Maurizy avait entrepris cette étude chez la souris et je l'ai aidé à finir une partie de ce travail après la fin de son contrat de thèse. Il a été montré que HSP90 a un rôle essentiel dans le développement précoce de la souris et c'est apparemment le cas aussi pour RPAP3 car des souris KO constitutive n'ont jamais pu être obtenues. Il a donc été préparé des souris KO inductible et ceci au niveau de l'intestin. Chez les mammifères, le tissu intestinal possède une architecture en cryptes et villosités où la prolifération cellulaire et la différenciation est capitale. En effet, en sept jours, les cellules souches CBC (« *Crypt Base Columnar* ») situées au fond des cryptes vont se diviser pour s'auto-renouveler et produire des progéniteurs. Ces derniers vont migrer au sein du compartiment d'amplification (TA, « *Transient Amplifying* ») dans les cryptes en se divisant et se différenciant en enterocytes (responsables de l'absorption des nutriments et de l'eau dans l'intestin grêle) ou en cellules sécrétrices (responsables de la production de mucus notamment dans le duodénum et le colon). Les cellules différenciées vont ensuite migrer le long de la villosité avant de mourir par apoptose et être éliminées. Il est également important de retenir que dans l'intestin grêle, les cellules souche CBC vont également produire des cellules de Paneth dont la durée de vie est très longue (3-6 semaines) et qui sécrète des peptides anti-microbiens et maintiennent les conditions de

niche de la crypte.

Pour étudier le rôle du R2TP dans l'homéostasie intestinale, des souris où la déplétion de RPAP3 est inducible grâce à la création de souris transgéniques où l'allèle de RPAP3 est flanqué de séquences loxP reconnues par l'enzyme recombinase Cre. Nous avons dans un premier temps montré que le promoteur de RPAP3 était actif dans les cryptes intestinales. L'injection de tamoxifène va activer l'enzyme et induire une excision de l'exon 7 de RPAP3 entraînant un stop prématuré produisant une protéine tronquée après le premier domaine TPR. De plus, nous avons localisé RPAP3 au fond des cryptes dans les CBC et cellules de Paneth (Figure 3C) tandis que le signal est diffus dans le colon. La déplétion inducible de RPAP3 dans un intestin adulte montre que RPAP3 n'est plus détectable dans l'épithélium du jejunum et du colon après cinq jours. De plus, à partir du jour 6, on observe une altération de la morphologie avec une désorganisation de l'épithélium. Ces résultats suggèrent que RPAP3 est nécessaire pour maintenir l'épithélium intestinal. En revanche, un seul allèle est suffisant pour le maintien de l'homéostasie tissulaire.

7 jours après injection du tamoxifène, on observe un arrêt du cycle cellulaire dans les cryptes et le TA. La perte d'expression de Ki67 (marqueur de prolifération) et d'Olfm4 (spécifique des cellules CBC) couplée à une baisse de l'incorporation de BrdU à J7 confirme que la perte de RPAP3 induit la disparition rapide de cellules souches et de progéniteurs, mais pas des cellules de Paneth différenciées. De plus, l'augmentation de la caspase 3 clivée et de p53 dans les cryptes et le TA indique que la délétion de RPAP3 affecte les cellules prolifératives en induisant la stabilisation de p53, l'arrêt cellulaire et l'apoptose des cellules intestinales.

Sachant que les clients de HSP90 malformés sont dégradés (*Koch S, 2017*), nous avons ensuite étudié le niveau d'expression des clients du R2TP dans les cellules intestinales à J6 après délétion de RPAP3 quand l'épithélium possède encore une architecture distincte. Des extraits protéiques de crypte ou de villosité ont été analysés par Western blot. Nous avons ainsi montré que pour les clients comme NOP58, PRPF8 ou EFTUD2 ne montrent qu'une faible diminution de leur expression à J6. Cela peut s'expliquer par le fait que HSP90 et le R2TP stabilisent les sous-unités des snoRNP et snRNP avant leur assemblage, sachant qu'elles sont extrêmement stables une fois en complexe (Lemm et al., 2006). Pour les PIKK, l'absence de RPAP3 entraîne une diminution drastique de l'expression de mTOR, ATM et ATR mais pas pour TRRAP dont l'expression reste stable. Ces résultats montrent la participation du R2TP dans la stabilisation des PIKK mais pas de TRRAP qui n'est pas un client du R2TP au niveau des cryptes et des villosités. Dans ces cellules, Rpb1, la grosse sous-unité de l'ARN Pol II s'accumule dans le cytoplasme au lieu d'être transportée dans le noyau. Ce phénotype n'est observé que dans les CBC et le TA révélant la nécessité du R2TP fonctionnel pour l'assemblage et l'import nucléaire de l'ARN Pol II dans les cellules en prolifération. Dans le colon, le remplacement des cellules épithéliales se fait sur un temps plus long

que dans l'intestin. Il faut attendre J10 après la déplétion de RPAP3 pour observer les mêmes phénotypes.

Enfin, nous avons évalué l'implication du R2TP dans la prolifération pathogénique associée aux cancers. L'ensemble de données CODREAD nous a permis d'identifier un enrichissement des ARNm de RUVBL1, RUVBL2 et RPAP3 dans les tumeurs colorectales primaires chez l'homme. Nous avons donc testé l'expression de RPAP3 sur des coupes de tissus de cancer colorectal (CRC) issus de patients grâce à un anticorps anti-RPAP3. Les résultats de ces marquages nous ont permis d'établir qu'une expression forte de RPAP3 dans les tissus CRC était associée avec un mauvais pronostic chez les patients.

Toutes ces observations nous permettent d'établir que le R2TP joue un rôle crucial dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal en régulant la prolifération des cellules souches et progéniteurs des cryptes. Des expériences supplémentaires ont aussi permis de montrer que ce rôle s'exerce aussi bien en présence ou en absence de p53.

Contribution personnelle

J'ai évalué l'expression des protéines clientes du R2TP dans des tissus exprimants ou étant déplétés pour RPAP3 (KO RPAP3). Pour cela j'ai utilisé des extraits de jejunum enrichi en cryptes ou en villosités conservés à -80°C (cf *Methods, Isolation of epithelial cells from the intestine*). J'ai lysé les cellules issues de cryptes ou de villosités intestinales et de colon dans un tampon RIPA (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholate) additionné d'inhibiteurs de protéase. J'ai ensuite déposé la même quantité de protéine pour chaque extrait sur un gel SDS-PAGE en gradient (BioRad) et fait le transfert sur une membrane de nitro-cellulose (Amersham Protran 0.2µm NC). Les extraits d'au moins trois souris contrôles ont été comparés aux extraits d'au moins trois souris KO RPAP3.

RPAP3 stabilise plusieurs familles de clients dans les cryptes intestinales

Dans un premier temps, j'ai montré dans les cryptes intestinales que l'expression de NOP58 (snoRNP à boîte C/D) était deux fois plus faible en absence de RPAP3 (Figure 5C). Pour les protéines de la particule snRNP U5, PRPF8 et EFTUD2 j'observe également que l'expression est deux fois moins importante dans les cryptes KO RPAP3 que dans les contrôles. Ces résultats montrent la dépendance de ces clients au R2TP dans l'intestin (Figure 5C). HSP90 et le R2TP sont connus pour stabiliser les clients seulement avant leur assemblage, et l'extrême stabilité des snoRNPs et des snRNPs peut expliquer la diminution modérée observée ici. Les PIKK ont également besoin du R2TP pour s'associer à certains de leurs partenaires. J'ai donc analysé

l'expression de plusieurs PIKK en fonction de la présence de RPAP3 (Figure 5D). L'expression de mTOR, ATM et ATR diminue fortement dans les extraits de souris KO RPAP3 validant l'importance du R2TP pour stabiliser ces clients. Cependant, tous les PIKK ne semblent pas affectés par l'absence de RPAP3 puisque l'expression de TRRAP ne varie pas (Figure 5D). Cela peut s'expliquer soit par le fait que le R2TP ne stabilise pas TRRAP, soit parce que TRRAP est une protéine très stable. Dans les extraits de souris contrôles, j'ai également montré que l'expression des clients PRPF8, EFTUD2 et ATR était plus importante dans les cryptes que dans les villosités (Figure Supplémentaire 5C). Ces données indiquent que le R2TP assemble ces machineries cellulaires dans les cellules progénitrices et CBC de l'épithélium intestinal.

L'inactivation du R2TP cible l'apoptose de manière p53 dépendante et indépendante

Afin de valider l'augmentation d'expression de p53 visualisée par immunofluorescence sur des tissus de souris KO RPAP3 (Figure 6A), j'ai réalisé des western blot sur trois extraits de souris contrôles ou KO RPAP3. Je visualise une augmentation de l'expression de p53 en absence de RPAP3 (Figure Supplémentaire 6A) dans les cryptes. Ces données suggèrent que l'inactivation du R2TP induit une augmentation de l'expression de p53 ce qui aboutit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose.

L'activité de RPAP3 est corrélée avec le renouvellement des cellules dans l'intestin et le colon

Enfin, j'ai étudié l'effet de la déplétion de RPAP3 dans le colon. J'ai analysé par western blot l'expression des clients mTOR, ATM (Figure 7B), NOP58 et PRP8 (Figure Supplémentaire 7C) à 7 jours de l'inactivation de RPAP3. J'avais montré que dans l'intestin l'expression des clients du R2TP diminuait en absence de RPAP3 (Figure 5 C et D). Dans le colon, cette diminution est moindre (Figure 7B et Figure Supplémentaire 7C) suggérant que le R2TP est toujours capable de stabiliser ses substrats dans le colon, même en absence de RPAP3, certainement à cause du taux de renouvellement des cellules qui est plus faible dans le colon que dans l'intestin.

Abstract

The R2TP chaperone cooperates with HSP90 to integrate newly synthesized proteins into multi-subunit complexes, yet its role in tissue homeostasis is unknown. Here, we generated conditional, inducible knock-out mice for *Rpap3* to inactivate this core component of R2TP in the intestinal epithelium. In adult mice, *Rpap3* invalidation caused destruction of the small intestinal epithelium and death within 10 days. Expression levels of R2TP substrates decreased, with strong effects of mTOR, ATM and ATR. Proliferative stem cells and progenitors deficient for *Rpap3* failed to import RNA polymerase II, and induced p53, cell cycle arrest and apoptosis. Interestingly, post-mitotic, differentiated cells did not display these alterations, suggesting that R2TP clients are preferentially built in actively proliferating cells. Besides, high RPAP3 levels in tissues from colorectal cancer patients correlate with bad cancer prognosis. Thus, in the intestine, the R2TP chaperone is essential for stem cell and progenitor proliferation, and correlates with tumoral outcome.

Introduction

The R2TP complex was first discovered in *Saccharomyces cerevisiae* as an HSP90 co-chaperone 1. HSP90 folds several hundreds of substrate proteins (also called “clients”) into their native, active state 2. The chaperone activity of HSP90 is coupled with its ATPase cycle and is regulated by a number of co-factors called co-chaperones. These co-chaperones aid client loading and regulate the HSP90 ATPase cycle 2. R2TP is an HSP90 co-chaperone but is unusual for two reasons: first, it is composed of four different subunits; second, it is specialized in quaternary protein folding, i.e. it enables the incorporation of clients into multi-subunit complexes (for review 3. In mammals, R2TP is composed of a heterodimer between PIH1D1 and RPAP3, which associates with a heterohexamer of RUVBL1 and RUVBL2 (Fig. 1A). PIH1D1 is involved in substrate recognition 4 while RPAP3 recruits the chaperones HSP90 and HSP70 56. RUVBL1 and RUVBL2 are related AAA+ ATPases that also have chaperone activity 7 8. Multiple contacts between the PIH1D1:RPAP3 heterodimer and the RUVBL1/2 heterohexamer allow regulation of their ATPase activity 6 9 10 11. Importantly, the RPAP3:PIH1D1 heterodimer is specific to R2TP whereas RUVBL1/2 are also part of other complexes such as the chromatin remodelers INO80 and SRCAP 12. In mammals, R2TP also associates with a set of six prefoldins and prefoldin-like proteins that are believed to prevent aggregation of some clients. Altogether, R2TP associated with prefoldins has been termed the PAQosome, for Particle for Arrangement of Quaternary structure 3.

The first documented R2TP clients were the small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs), which are required for the maturation of ribosomal RNAs 13 14. These particles can be grouped into two families, the C/D and H/ACA snoRNPs, each family being characterized by a set of four

proteins, which assembles with a variety of small nucleolar RNAs. Later on, other R2TP substrates have been identified, including the U4 and U5 spliceosomal snRNPs 15; 16 17, the nuclear RNA polymerases 18 19, and the PI3K-like kinases (PIKKs) mTOR, ATR, ATM, DNA-PK and SMG-1 20 45 .R2TP clients thus include several multimeric cellular complexes with crucial roles in transcription, ribosome biogenesis and cell growth 3 21, yet the role of R2TP in tissue homeostasis has not been studied. Most of our knowledge about R2TP originates from work in *S.cerevisiae*, mammalian cell lines or in vitro studies with recombinant proteins. In *S.cerevisiae*, R2TP is mostly required under stress conditions 13,22,23. In *D. melanogaster*, knock-down of Spag, RPAP3 ortholog, compromises early development and germline stem cells, but not somatic organogenesis nor homeostasis 24 (Chen et al 2018). The role of HSP90 on tissue development is also relatively poorly documented. Constitutive knock-out (KO) murine models showed that one cytosolic paralog of HSP90 was necessary for spermatogenesis while the other one was essential for early development 25; 26. Conditional models to address the role of HSP90 and R2TP in specific tissues are still missing.

In this study, we chose to address the role of R2TP in the intestine, the most dynamically self-renewing tissue in adult mammals. The intestine has a well-defined architecture which is particularly amenable to study cell proliferation and differentiation 27. Briefly, active stem cells called Crypt Base Columnar (CBC) stem cells reside at the bottom of intestinal crypts where they divide to either self-renew, or give rise to progenitors (see schematic Fig. 2B). Progenitors migrate through the transient amplifying (TA) compartment to undergo several rounds of division, and then differentiate. Differentiated cells migrate towards the tip of the villus, where they ultimately undergo apoptosis and are shed off from the tissue 28. Progenitors can differentiate into enterocytes, which are responsible for water and nutrient absorption and compose most of the small intestine epithelium. Alternatively, progenitors differentiate into one of the secretory subtypes. Among these, the goblet cells are the most represented. These cells produce a lubricant protective mucus layer, and their density increases from the duodenum to the colon. In the small intestine, CBC stem cells also generate long-lived Paneth cells (3-6 weeks), which secrete anti-microbial peptides and maintain crypt niche conditions (for review 28).

To study the role of R2TP in intestinal homeostasis, we generated murine models bearing a conditional knock-out allele of *Rpap3*. Indeed, *Rpap3* is central to R2TP, bridging together HSP90, HSP70, PIH1D1 and RUVBL1/2 6 9; 10;11. Our work uncovers a crucial role of R2TP in CBC stem cells and progenitors, by coupling the assembly of key cellular machineries with proliferation. In agreement, we found that high RPAP3 expression in the human colorectal cancer (CRC) tissue is associated with a shorter disease-free survival in patients.

Results

***Rpap3* is an essential gene in mice**

To generate *Rpap3* murine models, we tested different recombined murine Embryonic Stem cells (ES cells) available from the KOMP consortium (Supplementary Fig. 1A, B). In the *Rpap3*^{wtsi} allele, a strong acceptor splice site is introduced before exon 7. The resulting mRNA encodes a *Rpap3*^{wtsi} protein truncated after the first TPR domain, at amino acid 223, followed by a selection cassette and the bacterial β -galactosidase gene (Supplementary Fig. 1A, B). Site-specific recombination at the *Rpap3* locus was confirmed by Southern blot in one clone, H10 (Supplementary Fig. 1C). Injection of H10 ES cells into blastocysts generated 3 chimeras with germinal transmission. Intercrossing of *Rpap3*^{wtsi/+} animals did not yield any homozygous *Rpap3*^{wtsi/wtsi} animal, suggesting that this truncated *Rpap3* is homozygous lethal (0/34 pups; Supplementary Fig. 1A-B).

We used the β -galactosidase cassette to characterize *Rpap3* promoter activity. In the small intestine of *Rpap3*^{wtsi/+} animals, we detected β -galactosidase activity exclusively at the bottom of the crypts, intercalated between *lacZ* negative cells (Fig. 1B). This could correspond to either CBC stem cells or Paneth cells (see Fig. 2B for a schematic representation of the small intestinal crypts). In parallel, *Pih1d1* was detected in CBC stem cells and progenitors, but not Paneth cells (Fig. 1C). In the colon, the signal for *lacZ* activity was weaker than in the small intestine, and present throughout the epithelium (Fig. 1B), while *Pih1d1* was undetectable. Accordingly, Western blots analysis showed higher expression levels of *Rpap3*, and *Pih1d1*, in small intestinal crypts than in colon epithelium – while *Ruvbl2*, which is also part of complexes other than R2TP, did not vary significantly (Fig. 1D).

***Rpap3* is required for small intestine maintenance**

To generate a conditional knock-out strain, *Rpap3*^{wtsi/+} mice were crossed with mice carrying a transgene encoding the Flipase Flp²⁹. In the progeny, excision of the Flp-in cassette produced a *Rpap3* allele with exon 7 flanked by *loxP* sites (Supplementary Fig. 1A). *Rpap3*^{fllox} mRNA encodes a protein identical to wild-type *Rpap3*. Indeed, there was no bias in transmission nor any obvious phenotype in *Rpap3*^{fllox/fllox} mice. Excision of exon 7 by Cre recombinase produces a *Rpap3* ^{Δ 7} mRNA with a premature termination codon in exon 8, predicted to be degraded by the nonsense-mediated decay pathway (Supplementary Fig. 1A, B).

To obtain a constitutive deletion of *Rpap3* in the intestinal epithelium, *Rpap3*^{fllox/fllox} mice were crossed with *villin-Cre* (*VilCre*) transgenic mice. *VilCre* transgene encodes a constitutively active Cre that is specifically expressed in the epithelial cells of the small and large intestine³⁰. We were unable to generate homozygous *VilCre*; *Rpap3*^{fllox/fllox} animals (0/100 pups; Supplemental Fig. 1A),

showing that the absence of *Rpap3* in the intestinal epithelium is lethal. To bypass this problem, we turned to an inducible CreER^{T2} under the control of the same promoter (*VilCreER^{T2}*). This Cre-recombinase is also specifically expressed in the intestinal epithelium, but needs to be activated by tamoxifen³⁰. *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}* animals were healthy and did not present any obvious phenotype. We then injected intraperitoneally two doses of tamoxifen separated by an interval of 24 hours, in eight-week-old mice because the intestine is fully developed at this age. This yielded to an efficient recombination, already detectable one day after the first injection and only in the small intestine and colon epithelium but not in any of the other organs tested (Supplementary Fig. 1D, E). As a consequence, Rpap3 protein was no longer detected in epithelia from jejunum and strongly reduced in colon, 5 days after the first tamoxifen injection (Fig. 1E).

VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox} mice showed no obvious phenotype during the first days following tamoxifen injection but suffered from an important weight loss from day 6 onwards, such that most females and males had to be sacrificed at day 8 to 10 (Fig. 1F). The small intestines from these animals were shorter than those of controls and displayed a massive swelling with a transparent liquid or blood (Fig. 1G, H). Histological analysis revealed no alteration in the small intestine of *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}* mice within the first 6 days. At day 7, however, epithelial cells in the villi presented an altered morphology with surface enterocyte disorganization and focal crowding (Fig. 2A, B red square). At day 8, there was a severe destruction of the small intestinal architecture with villous atrophy and tufts of extruding epithelium (Fig. 2B). In contrast, the intestines of the *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/+}* mice did not show any phenotype (Fig. 2B), suggesting that under normal conditions, one allele of wild-type *Rpap3* is sufficient to maintain tissue homeostasis.

R2TP promotes cell proliferation within the epithelium

To understand the basis for this rapid degeneration of the intestinal epithelium, we measured Ki67 expression. Ki67 marks proliferative cells which are, in the intestine, the CBC stem cells and progenitors from the transient amplifying (TA) compartment (Fig. 3B). Immunostaining revealed a loss of Ki67 in the crypts of *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}* animals 7 days after tamoxifen injection (Fig. 2B and Fig. 3C). To directly monitor cell cycling, BrdU was injected into the mouse peritoneum two hours before sacrifice. BrdU is a nucleoside analog incorporated into the DNA during S-phase. BrdU staining was comparable from day 1 to day 6 in the crypts of control and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}* animals. At day 7 however, there were significantly less BrdU⁺ cells (Fig. 3D, E). This is coherent with the loss of Ki67 staining and confirms cycle arrest in the crypts and the TA compartment of the mutant animals. At day 8, the atrophic small bowel mucosa showed remnants of crypt glands with Ki67⁺ cells (Fig. 2B, black arrowheads). Overall, such epithelium destruction, with remnants of dysplastic Ki67⁺ crypt glands, phenocopies TCF4 KO³¹. TCF4 is the transcription

factor that integrates Wnt signaling to direct CBC stemness program³². Thus, R2TP appears to have cell-autonomous activity necessary for CBCs and progenitors.

To verify that CBC stem cells were affected, we performed immunostaining for Olfm4, a transmembrane protein commonly used for CBC identification³³ (Fig. 4A, B and Supplemental Fig. 4A). Olfm4 staining was similar between control and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice from day 4 to day 6 after tamoxifen injection. At days 7 and 8 however, Olfm4 expression was undetectable in most *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* crypts (Fig. 4A, B and Supplementary Fig. 4A), in agreement with the loss of Ki67⁺ staining (Fig. 2B and Fig. 3C). In the crypts, CBC stem cells intercalate between larger differentiated cells, called Paneth cells. These cells are Ki67⁻ and recognizable with the lysozyme marker (Fig. 4C, D) or by their typical cytoplasmic vesicles stained by Hematoxylin/Eosin (HE; Fig. 3C). In marked contrast to CBC stem cells, Paneth cells were detected in a comparable manner in the crypts of control and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice until day 8 (Fig. 3C and Fig. 4D). Altogether, these observations confirmed that the loss of *Rpap3* induces the rapid disappearance of proliferating stem cells and progenitors, but not of differentiated Paneth cells.

Interestingly, we observed cells with round, dense nuclei, resembling apoptotic cells, in the crypts of small intestines deficient for *Rpap3*. We verified this by immunostaining for cleaved caspase 3, a well-established marker of apoptosis. In control mice, few cleaved caspase 3 positive cells were visible at the tip of some villi, where they are shed. We detected significantly more cleaved caspase 3⁺ cells in the crypts of tamoxifen-injected *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice (Fig. 4E). These apoptotic cells were observed in the crypts and TA compartment, but not at the tip of villi, as observed in normal epithelia because of cellular turnover (Fig. 4F). Thus, *Rpap3* deletion eventually induces apoptosis of CBC stem cells and progenitors.

***Rpap3* stabilizes clients of diverse families in the crypt**

A prominent R2TP client is Rpb1, the largest subunit of RNA polymerase II (RNA PolII; ¹⁸; ¹⁹). R2TP incorporates neo-translated Rpb1 within RNA PolII in the cytoplasm, after which it is imported into the nucleus¹⁸. As expected, IHC for Rpb1 displayed a nuclear staining in control intestines (Fig. 5A). In *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals, 6 days after the first tamoxifen injection, when the epithelial architecture was still preserved, Rpb1 accumulated in the cytoplasm of CBCs and TA progenitors, but remained nuclear in differentiated epithelial cells, including Paneth cells (Fig. 5A). This suggested that *Rpap3* is necessary to assemble RNA PolII, and that this takes place in the proliferative compartment (Fig. 5B).

Misfolded HSP90 clients are usually degraded³⁴ so we determined the expression levels of R2TP clients in *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals at day 6. R2TP was initially characterized as an assembly factor for the box C/D snoRNPs, for which it recruits and chaperones NOP58, one of the

four core proteins in these particles¹⁴. Western blot analysis of crypt cell lysates showed a near two-fold reduction of NOP58 levels in extracts from *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}* animals, as compared to controls (Fig. 5C). R2TP stabilizes other non-coding RNPs in HeLa cells, including the U5 snRNP, a splicing ribonucleoparticle which includes PRP8 and EFTUD2¹⁶¹⁷. Expression of both proteins was also reduced by nearly two-fold in KO animals, showing their dependency on R2TP in small intestine (Fig. 5C). HSP90 and R2TP are thought to stabilize clients only before their assembly, and the extreme stability of snoRNPs and snRNPs may explain this moderate but consistent decrease observed here for their components³⁵.

In mammals, PIKKs consist of six structurally related proteins (ATR, ATM, DNA-PK, mTOR, TRRAP and SMG1). PIKKs are stabilized by the trimeric co-chaperone TTT^{36 37 38; 39} and in murine fibroblasts, TTT recruits R2TP to assemble PIKKs with their partners²⁰. By Western blot, we observed again a strong diminution of ATR and ATM, the primary sensors of DNA damage, as well as of mTOR, which activates translation and cell proliferation (Fig. 5D). These results show that R2TP participates in the stabilization of ATR, ATM, and mTOR. Yet, staining for ! H2AX, a marker of DNA damage, was similar in control and KO tissues (Supplementary Fig. 5A). In contrast to the other PIKKs, TRRAP level did not vary, either because R2TP does not chaperone TRRAP or because it is a very stable protein.

Interestingly, in control tissues, the above-identified R2TP substrates are concentrated in the crypts rather than in the villi. This was observed for the U3 box C/D snoRNP (Supplementary Fig. 5B) and components of the U5 snRNP, as well as ATR (Supplementary Fig. 5C). Altogether, these data show that R2TP assembles cellular machineries in the CBCs and progenitors.

R2TP inactivation triggers p53-dependent and independent apoptosis

Cell stress, including DNA damage or ribosome biogenesis defects, stabilize p53, which in turn arrests cell cycle and induces apoptosis (Stedman 2015). We observed a strong increase of p53 at day 6 in the crypts and TA compartment of KO mice (Fig. 6A, Supplementary Fig. 6A). Mutually exclusive staining for p53 and lysozyme confirmed the induction of p53 in CBCs and progenitors but not in Paneth cells (Fig. 6B and Supplementary. Fig. 6B).

To address the role of p53 in epithelium shrinkage following defective R2TP activity, we generated double knock-out *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}; Trp53^{flox/flox}* mice. We verified that adding floxed alleles did not alter the kinetics of *Rpap3* recombination, already effective 16hrs after tamoxifen injection (Supplemental Fig. 6C). And indeed, *Rpap3* KO was unaffected by hemizygous deletion of *Trp53* since *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}; Trp53^{flox/+}* mice phenocopied *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}; Trp53^{+/+}* mice (hereafter referred to as “*Rpap3* KO”). As reported earlier, invalidation of *Trp53* alone did not generate any noticeable phenotype (Chanrion et al., 2014)⁴⁰ (Supplemental

Fig. 6D). However, double KO mice showed a transient rescue. At day 6, *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}; Trp53^{lox/lox}* epithelium appeared hardly affected, with regular Ki67 crypt staining, unlike that of *Rpap3* single KO mice (Fig. 6C). At day 7, epithelium from double KO mice started shrinking, with partial loss of Ki67 staining, while that of single *Rpap3* KO mice were strongly disorganized (Fig. 6C). Finally, at day 8, epithelium from single *Rpap3* or double KO showed similarly strong erosion (Fig. 6C). Staining for p53 and Rpb1 confirmed near total penetrance of *Trp53* and *Rpap3* deletion (Supplementary Fig. 6D and Fig. 6D). We detected cleaved caspase 3 as well as typical round apoptotic cells in double *Trp53; Rpap3* KO and single *Rpap3* KO crypts but not in control nor p53 KO crypts (Fig. 6E). Altogether, these results show that inactivation of *Rpap3* induces p53 expression, cell cycle arrest and apoptosis. Yet, sustained defective R2TP activity results in epithelium degeneration, even in absence of p53.

***Rpap3* activity correlates with cellular turnover in small intestine and colon**

Depletion of the *Rpap3* protein was effective in *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* small intestines and colons (Fig. 1E). Yet, colons were not shorter in *Rpap3* KO mice (Fig. 1G), nor was their architecture modified until day 8, as observed by staining with Periodic Acid Schiff (PAS), Ki67, BrdU or CD44v6 labeling of colonic stem cells⁴¹, (Fig. 7A and Supplementary Fig. 7A, B). Western blot analysis revealed a diminution of R2TP substrates, mostly for mTOR and ATM. It was less pronounced than that in small intestinal crypts (Fig. 7B and Supplementary Fig. 7C) and was not accompanied by any detectable accumulation of Rpb1 in the cytoplasm (Supplementary Fig. 7D). Yet, p53 accumulated at the bottom of the crypt, where stem cells reside, and we measured a moderate increase of cleaved caspase 3⁺ cells (Fig. 7A, C and Supplementary Fig. 7E).

To analyze and compare the roles of R2TP on stem cells activity in both the small intestine and colon, we generated organoids simultaneously from both tissues, using mice treated with tamoxifen as previously described⁴². Crypts prepared from control small intestines grew to form organoids that budded after 72h in culture. In contrast, organoids prepared from KO mice degenerated from 48h on, with no observable budding (Fig. 7D). In parallel, control colonic organoids started differentiating at 72h and budded after 96h in culture. Colonic organoids from KO mice died at 72h without giving rise to budding organoids (Fig. 7D). Thus, R2TP is necessary for the survival and differentiation of both, small intestinal and colonic organoids, *ex vivo*.

To verify if colonic crypts renewal depended on R2TP activity *in vivo*, we generated *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals (Supplementary Fig. 8A). In these mice, GFP and the tamoxifen-inducible Cre are both under the control of the CBC- specific *Lgr5* promoter. This construct has a mosaic expression restricted to a few crypts⁴³. This allows the animals to survive and to compare *Rpap3*-deficient and -expressing crypts in the same intestines. Indeed, tamoxifen

treated *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2};Rpap3^{fllox/fllox}* mice did not show any visible physiological alteration and could survive for 3 weeks at least, while RT-qPCR verified the recombination of *Rpap3* locus in GFP⁺ cells (Supplementary Fig. 8B). Double staining for Rpb1 and GFP, to identify crypts with an active Cre showed that, seven days after the first tamoxifen injection, Rpb1 was localized in the nucleus of GFP⁻ crypts of the small intestine but accumulated in the cytoplasm of CBC stem cells and progenitors from GFP⁺ crypts (100% of GFP⁺ crypts; Fig. 8B and Supplementary Fig. 8A). In *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{+/+}* control mice, Rpb1 was nuclear in both GFP⁻ as well as in GFP⁺ crypts (Fig. 8A). At day 10, we did not detect any GFP⁺ crypt in the small intestine of *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice, possibly because recombinant CBC stem cells had been eliminated and replaced by GFP⁻ CBC-derived crypts. In the colon, Rpb1 localization was also affected but with a delay, as compared to the small intestine (Supplementary Fig. 8A, C). At day 7, Rpb1 was nuclear in GFP⁻ and GFP⁺ colonic crypts from *Lgr5-EGFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (Supplementary Fig. 8C). At day 10, however, Rpb1 accumulated in the cytoplasm of CBC stem cells and progenitors of GFP⁺ crypts (Fig.8B). In colons of control animals, Rpb1 was nuclear in GFP⁻ and GFP⁺ crypts (Supplementary Fig. 8C). Thus, R2TP assembles RNA Polymerase II in the colon, yet upon *Rpap3* invalidation, the effect on Rpb1 appears later than in the small intestine.

To understand this delay, we compared the cellular turnover in both tissues. For this, we injected the nucleoside analog BrdU as a cell tracer into wild type mice and sacrificed them subsequently at different time points (Fig. 8C). Two hours after injection, BrdU was incorporated exclusively by CBC stem cells and progenitors in both the small intestine and the colon (Fig. 8C). After one day, BrdU⁺ cells were detectable above the TA compartment in the small intestine, while some remained at the bottom of the crypt. BrdU⁺ cells then migrated to the tip of the villus at day 3, and were eliminated at day 4, in accordance with the kinetics previously described⁴⁴. In contrast, in the colon, migrating BrdU⁺ cells did not reach the tip of the crypt before day 4 and were still detectable at day 5 (Fig. 8C). This illustrates a slower cellular turnover in the colon than in the small intestine. Overall, this correlates with a slower accumulation of neo-synthesized Rpb1 in the cytoplasm of colonic cells, milder effects on other R2TP levels (Fig. 7 and Supplementary Fig. 7) and restricted phenotype (p53, caspase 3 activation) in this tissue.

High expression of RPAP3 correlates with poor prognosis in colorectal cancer patients

Our previous findings suggest a strong link between R2TP activity and cell proliferation in the intestine. To test if R2TP is also involved in pathogenic proliferation, we took advantage of the CODREAD dataset (available at <https://xenabrowser.net/>). Transcriptomic analyses showed a significant enrichment of mRNAs encoding RUVBL1, RUVBL2 and RPAP3 in human primary

colorectal tumors (n= 380) as compared to normal tissue (n=51), in line with a previous report on a smaller cohort ⁴⁵ (Fig. 9A).

This prompted us to test the expression of RPAP3 by immunohistochemistry on Tissue Microarrays (TMAs) sections from colorectal cancer (CRC) patients, employing customary anti-RPAP3 antibodies (unfortunately, this antibody detects human RPAP3 but not its murine homolog; ⁴⁶. We analyzed TMAs containing core tissues from patients diagnosed with CRC without pathological evidence of nodal involvement and distant metastasis. 157 out of 177 (88.7%) cases expressed RPAP3 in the tumor cell cytoplasm. The proportion of RPAP3-positive cells was in the range of 4-100%, with a mean \pm S.E. of 62.6% \pm 2.6. To dichotomize the RPAP3 expression level in RPAP3^{high} and RPAP3^{low}, an optimal cut-off value of 26% of positive tumor cells was chosen based on the Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis (AUC = 0.593) (Fig. 9B). The relationships between RPAP3 expression and clinico-pathological parameters were investigated by Pearson's χ^2 test: RPAP3 expression negatively correlated with the tumor stage of CRC ($P = 0.049$; Supplemental Table 1 and 2). Compared with stage I tumors, the expression of RPAP3 was decreased in stage II tumors ($p = 0.049$). Furthermore, compared with mucinous carcinoma, the expression of RPAP3 was increased in colorectal cancer of the adenocarcinoma type ($p = 0.025$). In addition, high RPAP3 expression was positively correlated with the occurrence of tumor relapse ($p = 0.003$) and patients' mortality ($p = 0.036$).

39 out of 123 (31.7%) patients with RPAP3^{high} tumors and 6 out of 54 (11.1%) patients with RPAP3^{low} tumors had disease relapse. Analysis of Kaplan–Meier curves showed that patients with RPAP3^{high} tumors had a lower Disease-Free Survival (DFS) rate than patients with RPAP3^{low} tumors ($P = 0.037$; Fig. 8B). Multivariate analyses of DFS adjusted for other prognostic factors confirmed that RPAP3 expression was a significant prognostic parameter influencing disease relapse (HR = 2.7; 95% CI, 1.2-6.5; $P = 0.023$; Supplementary Table 3), but not the overall survival of patients. These results provide evidence that high RPAP3-expression levels in CRC tissues are associated with poor patient prognosis.

In parallel, mTOR protein expression was evaluated by immunohistochemistry in tumors from the same cohort of colorectal cancer (CRC) patients previously characterized for the expression of RPAP3. Fifty-four out of 149 (36.2%) cases expressed mTOR in the cytoplasm of the CRC cells. The proportion of mTOR positive CRC cells was in the range of 11-100%, with a mean \pm S.E. of 42.5% \pm 5.3 (Supplementary Fig. 9). RPAP3 contributed only to 22% of mTOR expression levels ($\rho=0.226$, $p=0.007$), which were not correlated with DFS (Supplementary Fig. 9). In fact, up-regulation of the PI3K-Akt-mTOR pathway is generally associated with upstream mutations rather than elevated mTOR expression levels itself ^{47 48}.

Discussion

Since its discovery in 2005, biochemical and structural studies highlighted a chaperoning role for R2TP¹⁻³. RPAP3 is a central subunit within R2TP: it recruits the chaperones HSP70/90 *via* its TPR domains, PIH1D1 through a short peptide domain and the AAA+ ATPases RUVBL1/2 *via* its C-terminal domain^{6-9,10,11}. In turn, PIH1D1 tethers client subunits and regulates RUVBL1/2 ATPase activity (Horejsi et al., 2014)¹¹. Overall, R2TP appears as a central hub for complex assembly by coordinating the activity of HSP70/90 with that of RUVBL1/2 for client assembly into functional complexes. Most of the R2TP clients have been identified in mammalian cell lines^{19, 14, 18, 4, 17, 16} and we validated here that several of them depend on R2TP in intestinal epithelium. This includes PRP8, part of the U5 spliceosomal snRNP, and NOP58, a core component of box C/D snoRNPs. Another class of R2TP substrates are the PIKKs²⁰. Several studies have documented that these large proteins are stabilized by a trimeric adaptor called TTT, *via* recruitment of R2TP/HSP90^{38, 39, 37, 49, 5,20}. We show here that mTOR, ATR and ATM depend on *Rpap3* in intestinal crypts. Finally, a major R2TP client is RNA PolII. This key enzymatic complex is assembled in the cytoplasm prior to nuclear translocation¹⁸. The observed cytoplasmic accumulation of Rpb1 in *Rpap3* knock-out cells illustrates a defective assembly of RNA PolII.

Inactivation of *Rpap3* triggers p53 stabilization and cell cycle arrest, apoptosis and destruction of the intestinal epithelium. In the intestine, DNA damages and defects in ribosome biogenesis activate p53^{50,51, 52}. While mTOR, ATM and DNA-PKcs are dispensable for intestinal homeostasis^{53, 54, 55, 50}, *ATR* deletion induces epithelium disintegration because of replicative stress, and *Trp53* exacerbates this^{56,57}. Yet, p53 stabilization was observed in *Rpap3* KO small intestines before we could detect any significant alteration in R2TP client activity, such as DNA damage (as monitored by ! H2AX) nor ribosomal biogenesis (as observed by nucleolus morphology or RNAPol I activity) (Supplemental Fig. 4 and data unshown). This was even more striking in the colon, where R2TP clients were mildly affected (Fig. 7 & Supplementary Fig. 7). We hypothesize that a cellular checkpoint senses unassembled complexes to trigger p53 pathways – for instance, exposed protein surfaces that are normally buried into complexes could sequester the p53-E3 ligase MDM2, as observed for unassembled ribosomal proteins⁵⁸. Ultimately, double *Trp53 Rpap3* KO mice suffered from degraded epithelium. Hence, passed the p53 checkpoint, persistent defective activity of R2TP clients led to apoptosis and tissue degradation. Down-regulation of *ATR*⁵⁷, but also snoRNPs (required for ribosome biogenesis), and RNA PolII might induce apoptosis independently of p53, as described for proteins involved in general cellular mechanisms such as transcription, mRNA processing and translation⁵⁹.

We found that differentiated cells in the small intestine are barely affected by *Rpap3* removal, in contrast to the rapidly dividing CBC stem cells and TA progenitors. Indeed, Rpb1 accumulates in

the cytoplasm of proliferating cells, while it remains fully nuclear in the differentiated cells of the epithelium, a pattern which parallels p53 expression. We propose that R2TP assembles the basic cellular machineries in the proliferative compartment: CBC stem cells and progenitors. Several additional data support this model. First, *Rpap3* promoter activity was detected in the crypts and Pih1d1 in CBC stem cells and progenitors. Second, we found that some R2TP clients are more abundant in the intestinal proliferative compartment, such as (i) ATR, which signals defective DNA replication in the intestinal proliferative compartment⁵⁶; (ii) U3 snoRNP and U5 snRNPs. In addition, markers of RNA PolII activity, a potential R2TP client, accumulates in the crypts and TA compartment with decreasing levels along the crypt-villus axis⁵². Accordingly, a recent transcriptomic analysis along the crypt-villus axis detected mRNAs encoding ribosomal, splicing and transcription components at the very bottom of the villus, but not along the villus or at the tip⁶⁰. All these data support a model in which ribosomal biogenesis, transcription machineries and PIKK complexes are built in the rapidly proliferating stem cells and progenitors, and inherited by differentiated cells. These assembled complexes would suffice for the relative short lifespan of differentiated cells, until they are shed off from the villus (Fig. 9C). In *Drosophila*, the RPAP3 ortholog, Spag, is intrinsically required for ovarian Germline Stem Cell (GSC) maintenance, while KD of Spag does not affect the surrounding non-dividing cells of the ovary⁶¹. This exemplifies another case where RPAP3/Spag affects dividing stem cells, and suggests a general role of R2TP in proliferation, especially of active stem cells, across Metazoans.

A correlation between proliferation and sensitivity to *Rpap3* removal further extends to the colon. Indeed, R2TP substrates showed milder destabilization in the colon than in the small intestine, while Rpb1 accumulation in the cytoplasm of colonic recombinant crypts was detected several days later than in the small intestine. This correlates with the rate of epithelium turnover, which is slower in the colon than in the small intestine. Yet, *ex vivo* experiments demonstrated that crypts from both small intestine and colon depended on *Rpap3* to survive and differentiate. Thus, R2TP activity is generally required for homeostatic cell proliferation.

Tumoral cells are particularly sensitive towards HSP90 inhibition^{62, 63, 64}. This could be due to HSP90 folding of several proteins involved in oncogenic signaling pathways. Besides, an enhanced stability of the HSP90 interactome has been described in some tumors and coined the “epichaperome”,⁶⁵. In line with these, invalidation of a cytoplasmic HSP90 paralog (only essential for spermatogenesis;²⁵ diminishes lung metastasis in a murine model⁶⁶. Yet, in clinical trials, HSP90 inhibitors have been disappointing, showing strong cytotoxicity. One reason could be the broad range of HSP90 substrates, which also includes tumor-suppressors^{67 68}. To bypass this problem *Neckers et al.* suggested to target HSP90 co-chaperones that are specific for a given class of clients⁶⁹. We propose to consider R2TP as a therapeutic target, as a role for R2TP in intestinal

carcinogenesis is supported by several lines of evidences: (i) a higher expression of mRNAs encoding R2TP subunits in colorectal tumors, as compared to matching controls; (ii) high RPAP3 protein levels in biopsies of CRC patients with poor diagnostic, (iii) a strong dependency on RPAP3 in the proliferative compartment, (iv) sensitivity of cell proliferation in a p53-dependant and independent context. R2TP is interesting not only as a therapeutic target but also for diagnostic purpose, since R2TP components RPAP3 and PIH1D1 were both identified as part of the epichaperome of HSP90-sensitive tumours ⁶⁵.

In conclusion, we show that the R2TP chaperone plays a crucial role in the homeostasis of the intestinal epithelium, by regulating proliferating stem cells and progenitors.

Data and sample availability statement

Mouse sperm for the different strains is available upon request to pradet@crbm.cnrs.fr.

Transcriptomic analysis of R2TP subunits in human samples (Fig. 9A) used the UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation <https://xenabrowser.net/> ⁷⁰,

The data concerning the patient biopsies (Fig. 9B) are not publicly available because the database contains sensitive information that could compromise patient privacy.

The data supporting this study are available in the Article, Supplementary Information, Source Data, and, together with details about the experimental procedures, upon reasonable request to pradet@crbm.cnrs.fr.

Acknowledgments

We thank Solange Morera and EMBL facility for help with anti-RPAP3 antibody generation. The ES cells used for this research project were generated by the trans-NIH Knock-Out Mouse Project (KOMP) and obtained from the KOMP Repository (www.komp.org). NIH grants to Velocigene at Regeneron Inc (U01HG004085) and the CSD Consortium (U01HG004080) funded the generation of gene-targeted ES cells for 8500 genes in the KOMP Program and archived and distributed by the KOMP Repository at UC Davis and CHORI (U42RR024244). We thank the CIGM team in Institut Pasteur for technical support in microinjection experiments and animal husbandry and Laurent Le Cam for help with *Trp53^{flox}* model. We thank the in-house animal facilities PCEA and ZEFI, RAM, MRI for their excellent support. We acknowledge the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM) facility supported by SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa_Inserm_DGOS_12553, the European Regional Development foundation and the Occitanian Region for processing our animal tissues. We thank the SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa_Inserm_DGOS_12553. The work was supported by La Ligue Nationale Contre le

Cancer (équipes labélisées to EB, PJ) and the INCa grants PLBIO 2016-161 to DH, EB, MH, BPB and PLBIO 2018-158 to PJ. CM and CA Ph.D. fellowships were from la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Author contributions

C.M., C.A., B.L., M.G., C.L., V.P., M.F., C.P., J.B., F.G., C. V., B.P.B. performed experiments, F.L. generated murine model, N.T. and R.L. provided human TMA and analysis, D.H. analysed data, F.G., P.J. and D.H. advised on the work and commented critically on the manuscript. C.M., E.B., M.H., B.P.B. conceived the study, designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. B.P.B. supervised the research. All authors approved the content of the manuscript.

Methods

Human colorectal sample collection and analysis, and Tissue Microarray (TMA) construction.

A total of 177 CRCs were collected from patients surgically treated at the University “G. D’Annunzio”, Chieti, Italy, between 1996 and 2010. Only the CRC patients who did not receive adjuvant systemic therapy were included in the study. The median follow-up was 53 months (range 3-238 months). During the follow-up, 25.4% of CRC patients (45 out of 177) had a disease relapse, while deaths were observed in 18.6% of CRC patients (33 out of 177). Tumor stage was determined according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system (8th edition). Histologically, each CRC case was graded according to the criteria of the WHO classification of tumors of the digestive system (4th edition). Patients and tumor characteristics are summarized in Supplemental Table 1&2. The study was reviewed and approved by Institutional Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from all patients.

TMA were constructed by extracting 2-mm diameter cores of histologically confirmed neoplastic areas from the 177 CRC cases using a manual Tissue Arrayer (MTA, Beecher Instruments, WI), as previously detailed ⁷¹.

Immunohistochemical expression of RPAP3 and mTOR in human colorectal cancer (CRC).

RPAP3 and mTOR protein expression were evaluated by immunohistochemistry. TMA tissue sections were stained with a mouse monoclonal antibody raised against RPAP3 ⁴⁶ and a rabbit monoclonal antibody raised against human mTOR (clone 7C10, 1:100 dilution; overnight incubation; cat. number #2983; Cell Signaling). Antigen retrieval was performed by microwave treatment at 750 W (10 min) in 10 mmol/l sodium citrate buffer (pH 6.0). The anti-rabbit polymer kit (EnVision kit, K4003, Agilent) was used for signal amplification. DAB (3,3-Diaminobenzidine)

was used as chromogen. Spearman correlation was used to analyze the correlation between the expression of RPAP3 and mTOR. The Disease-Free Survival (DFS) was estimated using the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test.

Fifty-four out of 149 (36.2%) cases expressed mTOR in the cytoplasm of the CRC cells. The proportion of mTOR positive CRC cells was in the range of 11-100%, with a mean \pm S.E. of 42.5% \pm 5.3. The distribution of mTOR expression in CRC cases are reported as a box-and-whisker plot in Figure 1.

Mice generation and treatments.

Mouse experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals and comply the ARRIVE guideline. RPAP3^{wtsi/+} mice were generated from ES cells (JM8A1.N3, C57BL/6 N genetic background) generated by the trans-NIH Knock-Out Mouse Project (KOMP) and obtained from the KOMP Repository (www.komp.org). Genotyping was performed by PCR amplification using primers F5, R5 and R6, on the mouse tail genomic DNA (gDNA – Supplemental Fig. 1A). Mice were bred in an SOPF animal facility and maintained during the experiment in an SPF animal facility. Naive mice were minimum 6-week-old and euthanized by CO₂ and isoflurane. To activate the CreER^{T2}, controls and animals of interest received two intra-peritoneal (IP) injection of 2mg tamoxifen each. For BrdU incorporation assays, mice were intraperitoneally injected with 100 μ g Bromodeoxyuridine (BrdU) per gram body weight. The entire small intestine (cut in 3 parts) and colon were flushed with PBS, then with neutral buffered formalin (4% formaldehyde) and fix in 24h, dehydrated, and embedded in paraffin.

Histology and immunostainings.

TMA tissue sections were stained with a rabbit monoclonal antibody raised against human mTOR (clone 7C10) (1:100 dilution; overnight incubation; cat. number #2983; Cell Signaling). Antigen retrieval was performed by microwave treatment at 750 W (10 min) in 10 mmol/l sodium citrate buffer (pH 6.0). The anti-rabbit polymer kit (EnVision kit, K4003, Agilent) was used for signal amplification. DAB (3,3-Diaminobenzidine) was used as chromogen.

For histological analysis on murine tissues, tissue sections (4 μ m thick) were deparaffinized and rehydrated. They were stained with hematoxylin and eosin (HE), Periodic Acid Schiff staining (PAS) for preliminary analysis.

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

was performed using a Dako autostainer (Dako, Glostrup, Denmark). After neutralization of the endogenous peroxidase activity, the sections were incubated with the primary antibodies. Antibody was visualized using the Envision® system (Dako). Diaminobenzidine (Dako) was used as the chromogen and the sections were lightly counter-stained with hematoxylin. Slides were prepared by RHEM platform and visualized with a NanoZoomerslide scanner controlled by the NDP.view software (MRI platform).

For p53 immunofluorescence, paraffin-embedded tissue was cut into 3-µm-thick sections, mounted on slides, then dried at 37°C overnight. It was performed on the Discovery Ultra Automated IHC staining system from Roche Ventana. Following deparaffination with Discovery EZ Prep solution at 75°C for 24 minutes, antigen retrieval was performed at 95°C for 16 minutes with Discovery CC1 buffer. After blocking with (TBS-10%goat serum-5%BSA-5%milk-0, 3%triton), the slides were incubated after rinsing at 37°C for 60 minutes with a rabbit anti-P53 antibody (Leica, P53-CM5P-L, 1:250). Signal enhancement was performed using the OmniMap anti-Rabbit HRP (Roche, 760-4457) then Cy5 Kit (Roche, 760-238). Slides were then counterstained for 8 minutes with DAPI and manually rehydrated before coverslips were added.

For Rpb1/GFP immunofluorescence, antigen retrieval with 1mM EDTA was performed for 30 min at 99°C. Slides were blocked with 5%goat serum-PBS-0,3%triton X-100 for 1hr at RT then with primary antibodies overnight at 4°C. Samples were incubated with Dapi+ Secondary antibodies solution for 1h at RT. Slides were mounted with coverslip and ProLong Gold Antifade Mountant.

For immunohistochemistry (Rpb1, Lysozyme, Olfm4, Pih1d1), tissue slides were deparaffinized and rehydrated by performing the following washes: xylene, ethanol and dH₂O. Tissue slides were incubated with 10 mM sodium citrate pH6.0 (T0050, DiaPATH) for 20 min at 100°C for antigen retrieval, depending on the antibody. Endogenous peroxidases were inactivated with PBS-0,3% hydrogen (#H1009, Sigma). After blocking in 2.5 % blocking serum-5% BSA-5% non-fat milk for 30 min at room temperature, tissue slides were incubated with primary antibody overnight at 4°C. Then corresponding secondary antibody reagents (ImmPRESS™ kit, Vector Laboratories), directed against mouse, goat or rabbit antibodies were used for detection.

Incorporation of BrdU in proliferating intestinal epithelial cells was detected using an anti-BrdU antibody (Biolegend, 1:100) after deparaffinization of the tissues, antigen retrieval in citrate buffer, as described above, and DNA denaturation using 2NHCl for 1H at 37°C followed by an incubation in 0.1M borax buffer pH9. Revelation was performed using the Avidin/Biotin Vectastain System kit (Vectorlab, USA) according to the protocol.

All antibodies used for immunostainings are described in Supplemental Table 4 and validated by the manufacturers.

! ! *galactosidase activity*. Small intestines and colons cryo-preserved were cut to slices of 10 µm thickness. Samples were treated with 0.5% glutaraldehyde for 10 min at room temperature, followed by 24hrs incubation at 37°C in a staining solution containing 1 mg/ml X-gal, 5 mM potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆), 5 mM potassium ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆) and 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton in PBS.. Samples were washed in PBS for 5 min, counterstained with Nuclear Fast Red and briefly rinsed with dH₂O before mounting on aqueous mounting agent Aquatex (108562; Merck).

U3 snoRNA FISH.

Small intestines and colons cryo-preserved were cut to slices of 10 µm thickness. The frozen sections were fixed in PBS 1X/ paraformaldehyde 4% at room temperature for 60 min, followed by permeabilization either with ethanol 70%, overnight at 4°C for in situ hybridization, which was performed with Cy3 labeled oligonucleotides against U3 SEQ. After several wash, the slides were staining with DAPI and mounted in Vectashield.

Microscopy and imaging.

Histological slides were scanned using Nanozoomer 2.0 HT scanner with a 40x objective, and visualized with NDP.view2 viewing software (Hamamatsu). Fluorescent images were acquired on a brightfield microscope (Leica) using Metamorph software or inverted Confocal SP5 (Leica) using the Leica LAS AF software. Images were processed with ImageJ. Images were assembled and adjusted with Adobe Photoshop/ Illustrator.

Isolation of epithelial cells from the intestine.

Small intestines and colons were isolated and flushed with cold PBS. Colon and the 3 intestine fragments were cut open length-wise, then kept in 10 ml cold wash buffer (PBS, 2% FBS and antibiotics). Tubes were shaken several times by hand to wash the fragments and put into 15 ml falcon tube containing 10 ml CE buffer (PBS, 1% BSA, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5, 6 mM glucose). Tubes were placed on a vertical shaker at 37°C for 30 min. After removing tissue, cells were collected by centrifugation at 1410 rpm for 7 min. They were washed in 10ml wash buffer. Collected cells were split in different tubes and stored at -80°C.

To enrich for crypt-cells portion, before the incubation with the lysis buffer, the samples are scrapped with a slide to remove the villi part. These villi cells are collected by pipeting in 1 ml of cold PBS. The rest of organ is incubated with 10 ml lysis buffer to dissociate crypt cells.

Organoids.

Colons and small intestines were dissected, inverted on a stick, cut longitudinally then washed extensively in cold PBS-supplemented with Penicillin/Streptomycin. After cutting them in 0.3 cm long pieces, they were incubated in 10 ml of cold PBS. Pieces were washed 5 to 10 times in cold PBS with antibiotics and then treated for 30 minutes at 4°C (on a roller) with PBS-25mM EDTA for the colon and PBS-2mM EDTA for the small intestine. After sedimentation, the pieces were washed four times in 10 ml of cold PBS. For each wash, corresponding to Fraction 1 to 4, the supernatant was strained in a 70µm mesh filter. Each fraction was then centrifuged at 600g for 5 minutes and checked for the presence of well-formed crypts under the microscope. Usually fractions 3 and 4 were used for the organoid culture. 200 crypts were resuspended in 50µl of matrigel in WENR (Wnt3a, EGF, Noggin, R-spondin-1) media for the colon and ENR (EGF, Noggin, R-spondin-1) media for the small intestine and microscopically inspected once a day, as described⁴².

Western blots.

Proteins were prepared from cell preparation by lysis in cold RIPA buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholate) supplemented with inhibitors. Protein lysates were separated by gradient 4%-15% SDS-PAGE (BioRad) and transferred to a nitro-cellulose membrane (Amersham Protran 0.2µm NC). Membranes were blocked with 2, 5% non-fat milk (w/v) in TBS with 0.05% Tween and incubated with the appropriate primary antibodies at the appropriate dilution and followed by incubation with secondary antibodies conjugated to a fluorophore. Fluorescence was revealed using a scanner (Amersham Typhoon).

Primary antibodies from Cell Signaling: ATM D2E2 (CST 2873S) rabbit at 1/1000, ATR E1S3S (CST 13934S) rabbit at 1/1000, mTOR (CST 2972S) rabbit 1/1000, p53 1C12 (CST2524S) mouse 1/1000; PRP8 (sc-30207, Santa Cruz) rabbit 1/200; from Abcam: EFTUD2 (ab72456) rabbit 1/2000, GAPDH (ab8245 6C5) mouse 1/10000; and from Sigma: NOP58 (HPA018472) rabbit 1/100, RPAP3 (SAB1411438) rabbit 1/1000, Tubulin (I2G10) mouse 1/500, TRRAP 2TRR-1B3 (MABE1008) mouse 1/1000. All antibodies have been validated by manufacturers.

DNA extraction.

Samples are incubated in 100 µl of alkaline lysis buffer (NaOH 25mM, EDTA 0,2mM) with at 92°C for 20 min. Then, they are mixed with 100 µl of neutralizing reagent (Tris-HCl- pH 5, 40mM). 2 µl were used for PCR. PCR products are respectively 400bp and 300bp for floxed and wild type allele.

Southern blot.

Briefly, ES cells were incubated overnight at 65°C in 100mM Tris HCL pH8.8 - 5 mM EDTA -

0.2% SDS - 200 mM NaCl with 0, 1 mg/ml proteinase K in a humid chamber. On the following morning, the lysates were extracted twice with phenol pH7, 0-8, 0 and once with chloroform and precipitated with NaCl/EtOH. Following recovery, 10 – 15 ! g genomic DNA were digested for 24hrs to 48hrs with appropriate highly concentrated restriction enzymes (40-50 U/! 1 – 10 U/! g gDNA). The analysis was performed by Southern blot as described in ⁷².

PCR for genotyping.

Initial denaturation:95°C (2min), Denaturation 95°C (30sec), Annealing 55°C (45sec), Extension 72°C (45sec), Final extension: 72°C (2min) 35 cycles. Primers: RPAP3: F5 (GGTGCCACAGTGTGAGTG), R5 (TGCCTCCTGACTCACTACAG, R6 (ACCGTGTCGCTACGTCAGTGC); CREERT2-F (TTACGGCGCTAAGGATGACT), CREERT2-R (AAGGCCAGGCTGTTCTTCTT); P53-F (TGC TAG ATG CTT AGG GCT GC), P53-R (GAC TGG CCC TTC TTG GTC TT).

RT-qPCR

were performed after DNase-treated RNA extracted with Trizol, using Superscript III and LightCycler 480 SYBR Green I master mix (Roche) in a LightCycler 96 (Roche) and primers *Rpap3* forward (ACAAACAGAGCGTCGGCTTA), reverse for all mRNAs (ACTTCTGCAGAGCAAACCGA), or for full length mRNAs only (TCTGGCTCCAGTTCTAACACTT). Results were analyzed with the manufacturer's dedicated software.

Statistical analysis.

For the outcome endpoints, the disease-free survival (DFS) was defined as the measure of time after treatment during which one of the following events occurred: relapse at local or distant sites, or intercurrent death without recurrence. Overall survival (OS) was defined as the time between surgery and death from any cause. Survival curves were analyzed by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Cox's proportional hazards model, adjusted for other prognostic factors (i.e., gender, tumor location, tumor grade, tumor stage, and RPAP3 status), was used to evaluate the association of RPAP3 expression with outcome.

Transcriptomic analysis of R2TP subunits in human samples were extracted from the CODREAD cohort available at UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation <https://xenabrowser.net/> ⁷⁰. One-way ANOVA test was performed using GraphPad Prism 5.0.

Statistical analysis was performed employing the following two statistical software packages:

GraphPad Prism 5.0 and SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL); $p < 0.05$ was considered as statistically significant. For group comparisons, normality was first tested to choose a pertinent statistical test, as described in the text and Fig. legends.

Figure 1

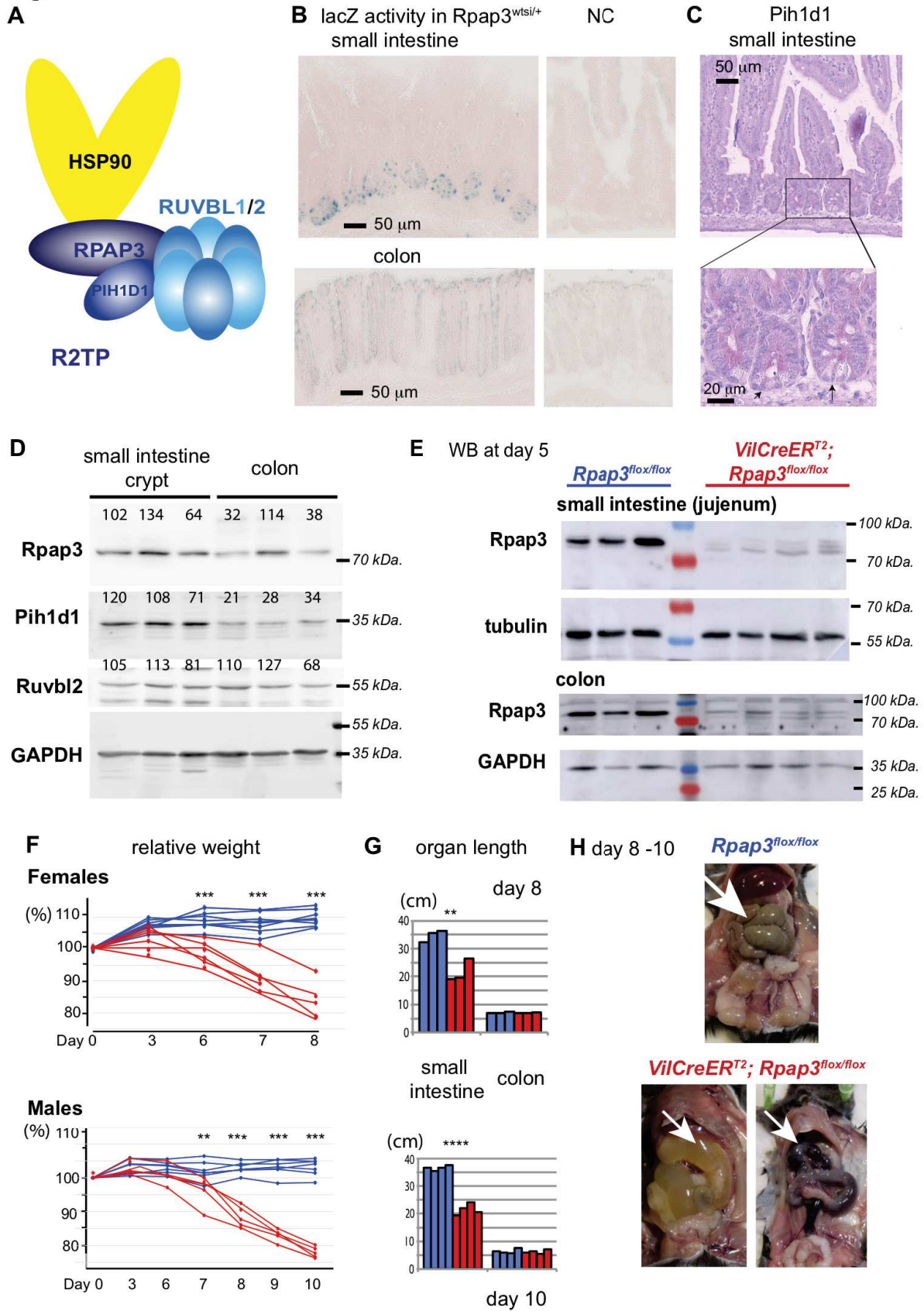


Figure 1: *Rpap3* deletion compromises the small intestine and mouse survival.

(A) Schematic representation of R2TP with its four subunits (RPAP3, PIH1D1 and the RUVBL1/2 hetero-hexamer). RPAP3 is the core subunit that contacts directly HSP90, PIH1D1 and RUVBL1/2.

(B) ! galactosidase activity in *Rpap3*^{wtsi/+} small intestines (top) and colon (bottom), as compared to negative controls (n=2). Scale bars=50 ! m are identical for all images.

(C) IHC of Pih1d1 in the small intestine. Counter coloration of DNA with hematoxylin, with magnification (bottom). Top picture: bar represents 50 ! m. Inset: arrows point to CBC stem cells, intercalated between Paneth cells with distinctive pink granules in the cytoplasm. Bar is 20 ! m.

(D) Comparison of R2TP component expression levels between small intestinal and colonic crypts. Western blots were revealed with antibodies against the indicated proteins in extracts of the jejunum and the colonic epitheliums of *RPAP3*^{lox/lox} controls animals (red). Each lane was loaded with the lysate obtained from one animal. Signal quantification relative to GAPDH levels are indicated on top of each lane. Apparent molecular weight is indicated on the right.

(E) Depletion of Rpap3 after tamoxifen injection. Western blots were revealed with antibodies against the indicated proteins in extracts of the jejunum and the colonic epitheliums of *RPAP3*^{lox/lox} controls (blue) or *VilCreER*^{T2}; *RPAP3*^{lox/lox} animals (red), 5 days after the first tamoxifen injection. Each lane was loaded with the lysate obtained from a single animal. Molecular sizes are indicated on the right.

(F) Individual weight variations in females (top panel) and males (bottom panel) of tamoxifen treated *VilCreER*^{T2}; *RPAP3*^{lox/lox} animals (red curves, n= 6 females and n=5 males) and *RPAP3*^{lox/lox} controls (blue curves, n=8 females and n=7 males). Individual weight was set at 100% for each animal at day 0, and analyzed by ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (** p<0.01; *** p< 0.001).

(G) Length of small intestines and colons from *VilCreER*^{T2}; *RPAP3*^{lox/lox} mice (red bars) and controls (blue bars) measured at day 8 and day 10 of females (top, n=3) and males (bottom, n=4), respectively. Unpaired t-test, ** p<0.01; *** p<0.001.

(H) Representative images of small intestine (white arrowheads) from *VilCreER*^{T2}; *RPAP3*^{lox/lox} animals, which were filled with liquid (left panel) or blood (right panel) from day 8 to 10; a control organ is shown above.

Figure 2

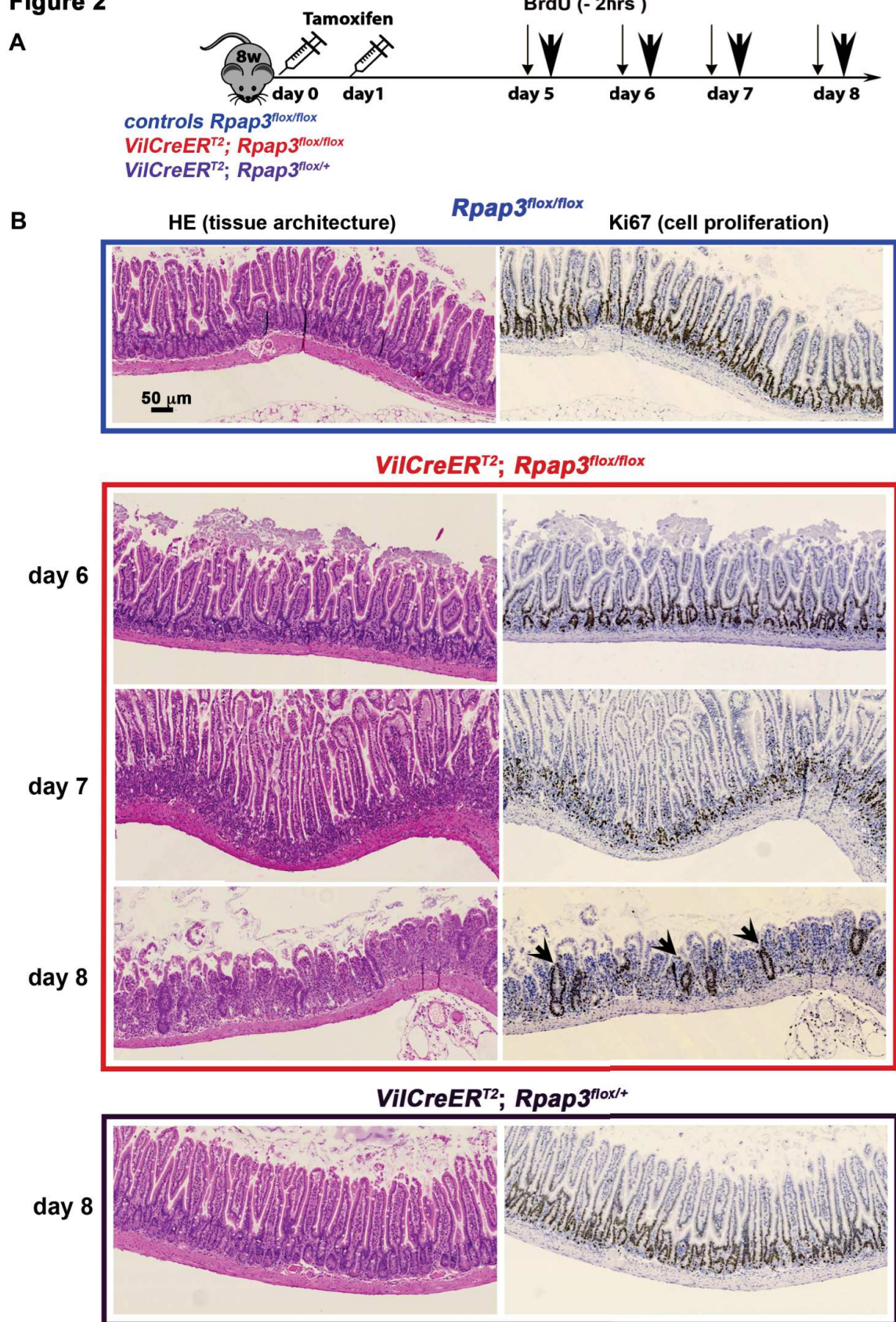


Figure 2: *Rpap3* is necessary for proliferation in the small intestine.

(A) Schematic representation of the experimental setting: 8-week-old mice of the indicated genotype received 2 sequential injections of tamoxifen 24hrs apart, and were analyzed 5 to 8 days after the first injection. 2 hrs before each sacrifice, BrdU was injected intra-peritoneally to detect cells in S-phase (thin arrows).

(B) Pictures of jejunum tissue sections stained with HE (left) or by IHC with anti-Ki67 antibodies (right panels – Ki67 signal is brown) at different days after the first tamoxifen injection. Black arrowheads indicate remnants of crypt glands with Ki67⁺ cells observed at day 8. Scale bar is shown in control HE panel. Each panel is representative of 8 to 12 animals from three independent experiments. Scale bar is 50! m.

Figure 3

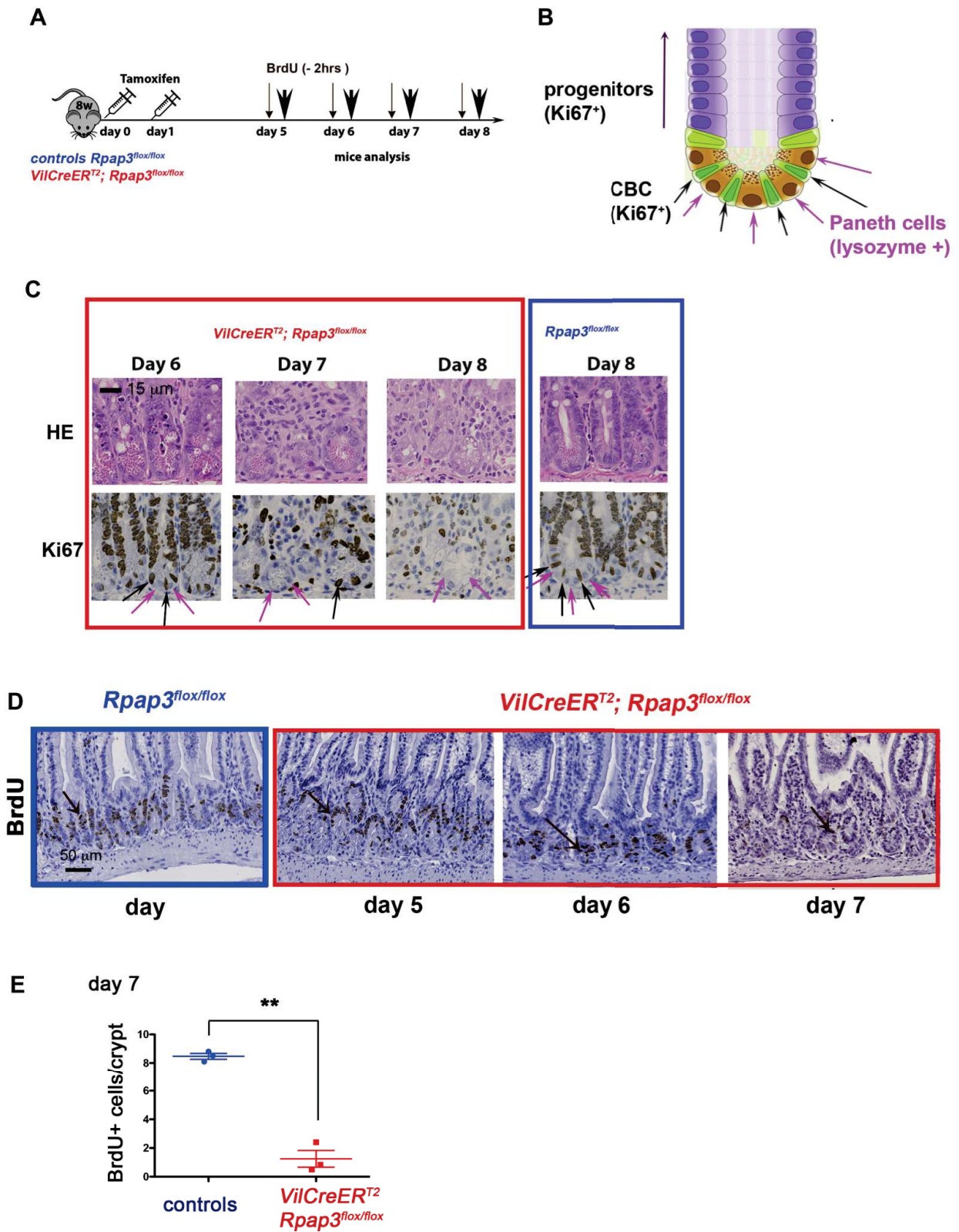


Figure 3: *Rpap3* is required for proliferation in the small intestine.

(A) Schematic representation of the experimental setting: 8-week-old mice of the indicated genotype received 2 sequential injections of tamoxifen 24hrs apart, and were analyzed 5 to 8 days after the first injection. 2 hrs before each sacrifice, BrdU was injected intra-peritoneally to detect cells in S-phase (thin arrows).

(B) Schematic representation of a crypt from the small intestine, with CBC stem cells (in green) sandwiched between Paneth cells (in brown) and progenitors forming the TA on top (purple).

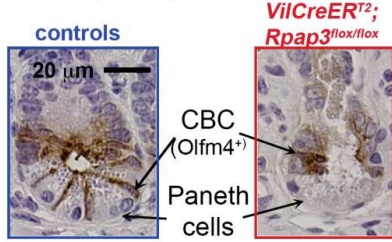
(C) Representative pictures of jejunum tissue sections stained with HE (top) or by IHC with anti-Ki67 antibody (bottom, Ki67 signal is brown) at indicated days after the first tamoxifen injection. Scale bar is shown in control HE panel. Each panel is representative of 8 to 12 animals analyzed in three independent experiments. Scale bar is 15 ! m.

(D) Representative pictures of jejunum taken from control (boxed in blue) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals (boxed in red), stained by IHC with anti- BrdU antibodies (n=3-6 animals/ time point from two independent experiments). Scale bar shown in control panel is 50 ! m.

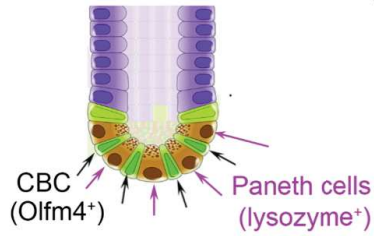
(E) Graph shows mean number of BrdU⁺ cells/crypt in controls and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals at day 7. Each point represents the average number of BrdU⁺ cells calculated in n>35 crypts from two different zones per animal (n=3). Mean values with S.E.M are indicated for each experimental group. Unpaired two-tailed t test with Welch's corrections (t=11.66, df=2) indicates significant difference between controls and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals (p=0.0073; n=3).

Figure 4

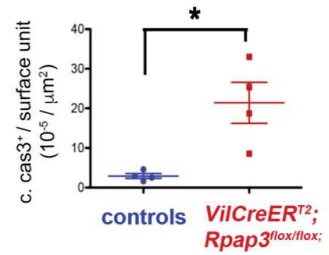
A. Olfm4 (CBCs)



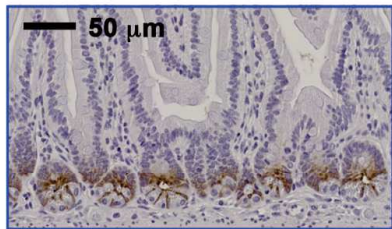
C



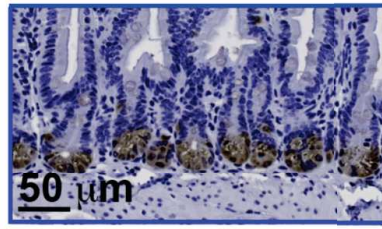
E. cleaved caspase 3 (apoptosis) day 6



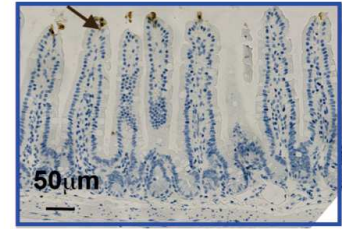
B. Olfm4 (CBCs)



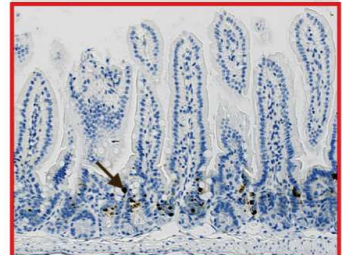
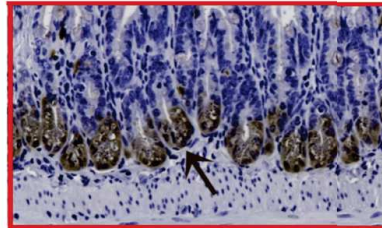
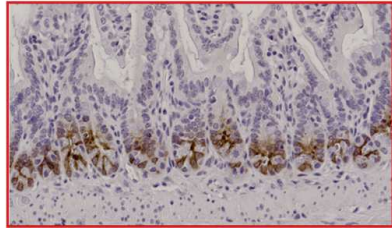
D. lysozyme (Paneth cells)



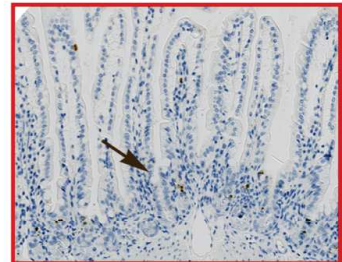
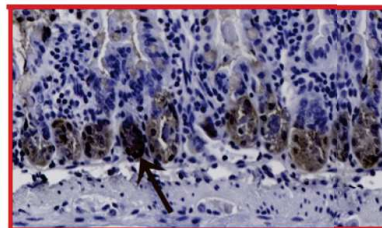
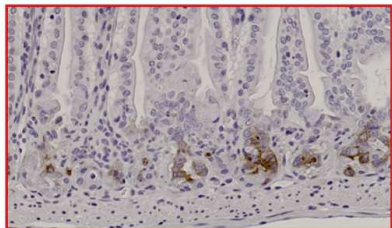
F. cleaved caspase 3 (apoptosis)



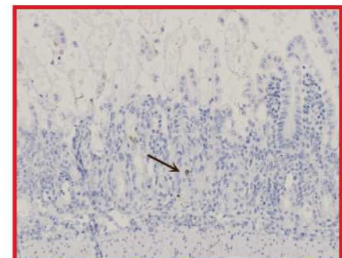
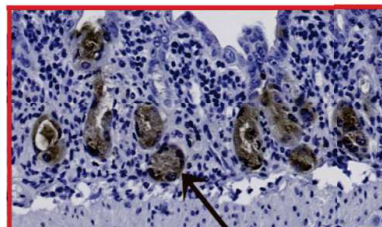
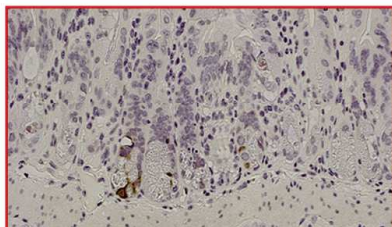
day 6



day 7



day 8



VilCreER^{T2}; Rpap3^{flox/flox}

Figure 4: *Rpap3* invalidation induces CBC stem cells loss, p53 stabilization and apoptosis in the proliferative compartment of the small intestine

(A) Representative micrographs of tissue sections immunostained for Olfm4, in the crypts from control animals (left), or *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals 7 days after the first tamoxifen injection (right).

(B) Staining for Olfm4 in the jejunum from control (top panel) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals 6 to 8 days after the first tamoxifen injection. Scale is identical in all images (n=2 to 4 animals/time point from at least two independent experiments).

(C) Schematic representation of a crypt from the small intestine, with CBC stem cells (in green) sandwiched between Paneth cells (in brown) and progenitors forming the TA on top (purple).

(D) Representative micrographs of tissue sections immunostained for lysozyme, a specific marker of Paneth cells, in the jejunum of control (top) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice from day 6 to day 8 (black arrows). Panels are representative for 2-3 animals/time-point from two independent experiments. Scale bar, identical in all pictures, is 50 μ m.

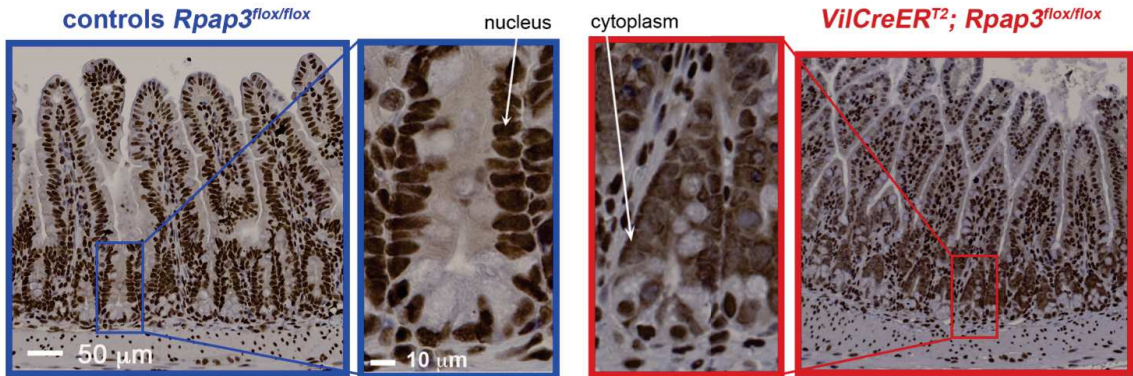
(E) Total number of apoptotic cells identified by cleaved caspase 3 (cleaved cas3⁺) per surface (μ m²) of jejunum for each mouse analyzed, at day 6. Mean values with S.E.M are indicated for each experimental group. Unpaired two-tailed t-test with Welch's correction indicates significant difference between controls and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals (p=0,0384; t=3,538, df=3, n=4).

(F) Micrographs are tissue sections stained for cleaved caspase 3 in the jejunum. In control animals, cleaved cas3⁺ cells (brown arrows) are mainly detected at the tip of the villi, as a result of epithelial turnover (top panel). In the jejunum from *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals, at day 6 and 7, cleaved caspase 3⁺ cells were detected within the crypts (brown arrows). Panels are representative from 2 to 4 animals/time point, from two independent experiments.

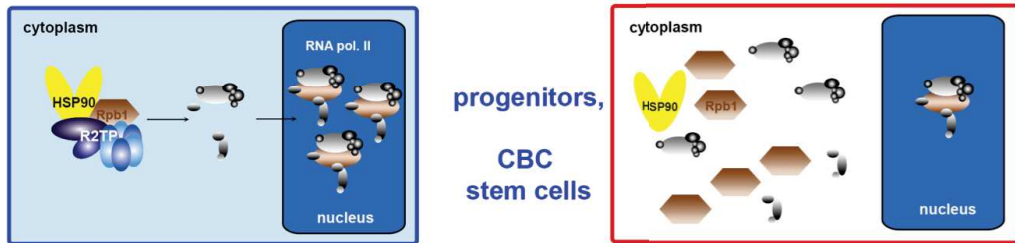
Figure 5

A

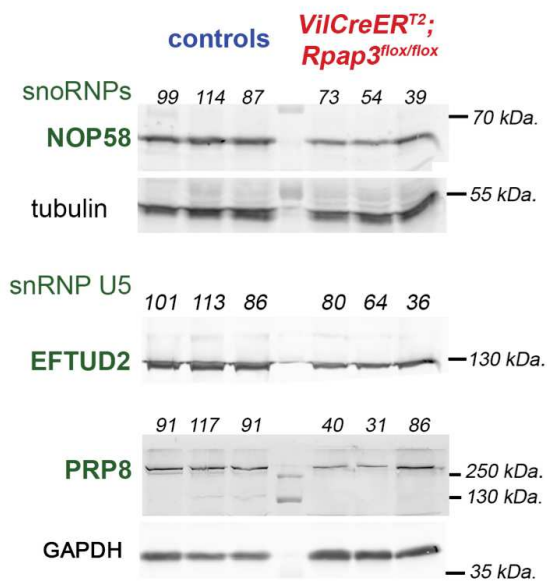
IHC anti-Rpb1 (RNA polymerase II catalytic subunit)



B



C. non-coding RNPs in crypts



D. PIKKs in crypts

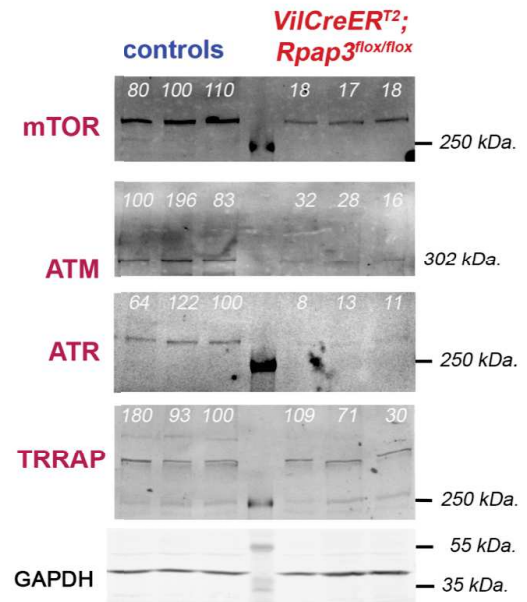


Figure 5: *Rpap3* deletion decreases expression of R2TP clients and leads to cytoplasmic accumulation of RNA polymerase II in intestinal crypts and TA compartment.

(A) Images are tissue sections of small intestines stained by immunohistochemistry (IHC) for Rpb1, the catalytic subunit of RNA polymerase II, from control *Rpap3^{fllox/fllox}* mice (blue frame, left panel), or *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* animals at day 6 (red frame, right panel), with magnifications of crypts (scale bars used for the two magnification insets are identical between blue and red frames). Note that the staining in stromal cells is nuclear in both wild-type and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* animals (stromal cells do not express the Cre) and control epithelium, while it becomes cytoplasmic in the mutant epithelium. The scale is identical for both pictures. Panels are representative for n=6 animals from three independent experiments.

(B). Schematical representation of the micrographs in (A). In control epithelial cells, R2TP incorporates Rpb1 into RNA PolIII, which is then imported into the nucleus. In the absence of *Rpap3*, neo-synthesized Rpb1 accumulates in the cytoplasm.

(C, D) Western blot analysis of preparations enriched for epithelial crypt cells from the jejunum of animals, sacrificed 6 days after the first tamoxifen injection. NOP58, EFTUD2, PRP8 (C), mTOR, ATM, ATR and TRRAP (D) were detected with specific antibodies. Tubulin and GAPDH were used as loading controls. Quantification of the signal ratios are indicated on top of each lane (average for the control ratios was arbitrarily set to 100). Each lane was loaded with the lysate obtained from one animal of the indicated genotype (6 animals per gel). Apparent molecular weight is indicated on the right.

Figure 6

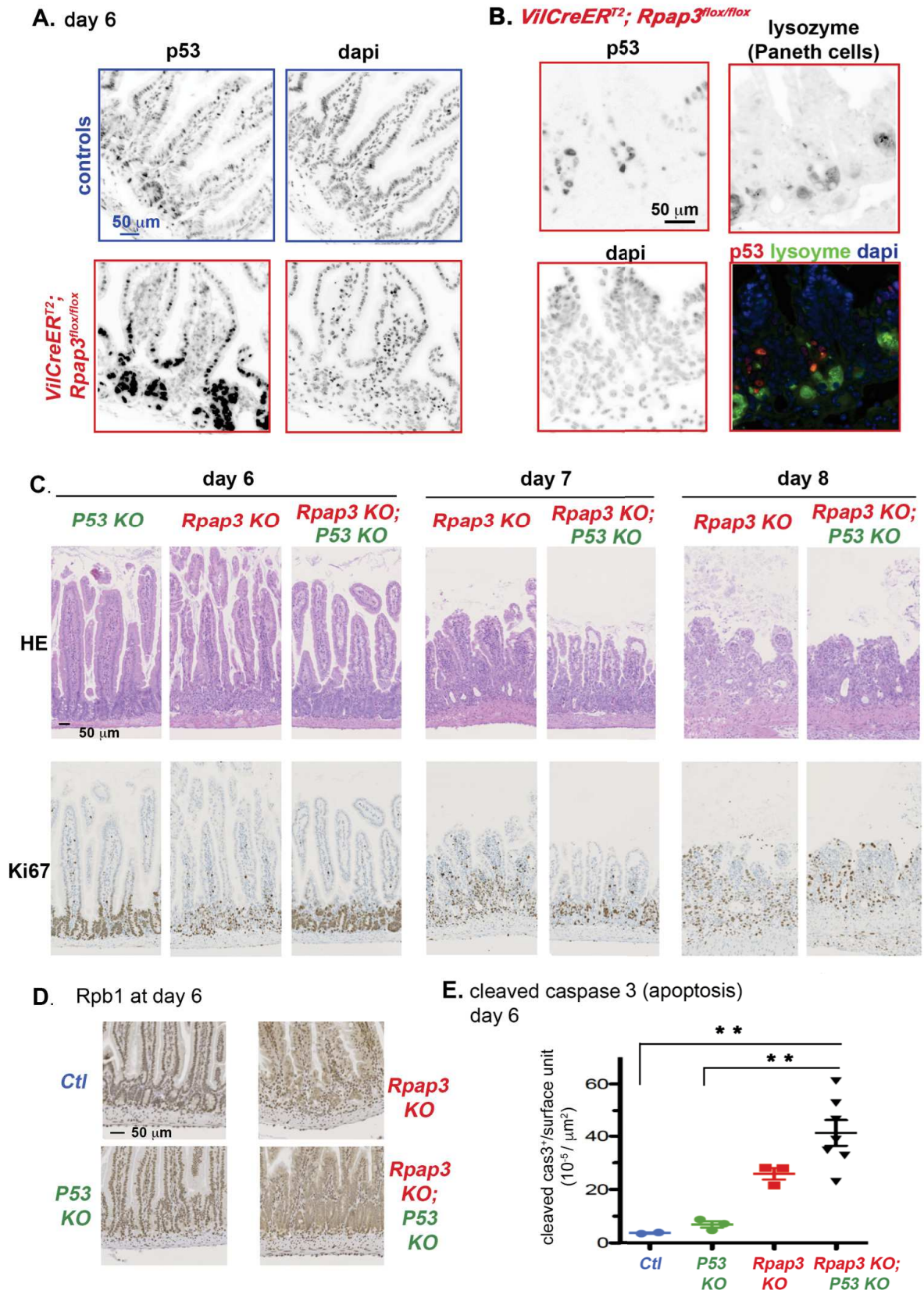


Figure 6: R2TP invalidation triggers p53 -mediated apoptosis

(A) Micrographs are tissue sections stained for p53 by immunofluorescence in controls (top) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice (bottom) at day 6 (n=4). Nuclei were stained with DAPI (blue).

(B) Micrographs are tissue sections stained by immunofluorescence for p53 (Cy5, red) and lysozyme (Alexa 488, green), a marker of Paneth cells, in *VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice at day 6 (n=2). Nuclei were stained with DAPI.

(C) Pictures of jejunum sections stained with HE (top) or by IHC with anti-Ki67 antibodies (bottom) in *P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/+}; Trp53^{lox/lox})*, *Rpap3 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}; Trp53^{lox/+})* and double *Rpap3 KO; P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}; Trp53^{lox/lox})* mice at day 6 to 8 after the first tamoxifen injection. Pictures are representative for each single KO (n=3) and double KO (n=5-7) mice, from three different experiments. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar is shown in the control HE panel.

(D) Pictures of jejunum sections stained by IHC with anti-Rpb1 antibody in control, *P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/+}; Trp53^{lox/lox})*, *Rpap3 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}; Trp53^{lox/+})* and double *Rpap3 KO; P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}; Trp53^{lox/lox})* mice at day 6 following tamoxifen injection. Pictures are representative of n=3 for each single KO, n=7 for double KO, from two different experiments. Dapi: nuclei.

(E) Total number of apoptotic cells at day 6 per surface (μm^2) of the jejunum for each mouse analyzed. Mean values with S.E.M are indicated for each experimental group. ANOVA analysis (p=0.0006) with Tukey's multiple comparison post-test (** p<0.001).

Figure 7

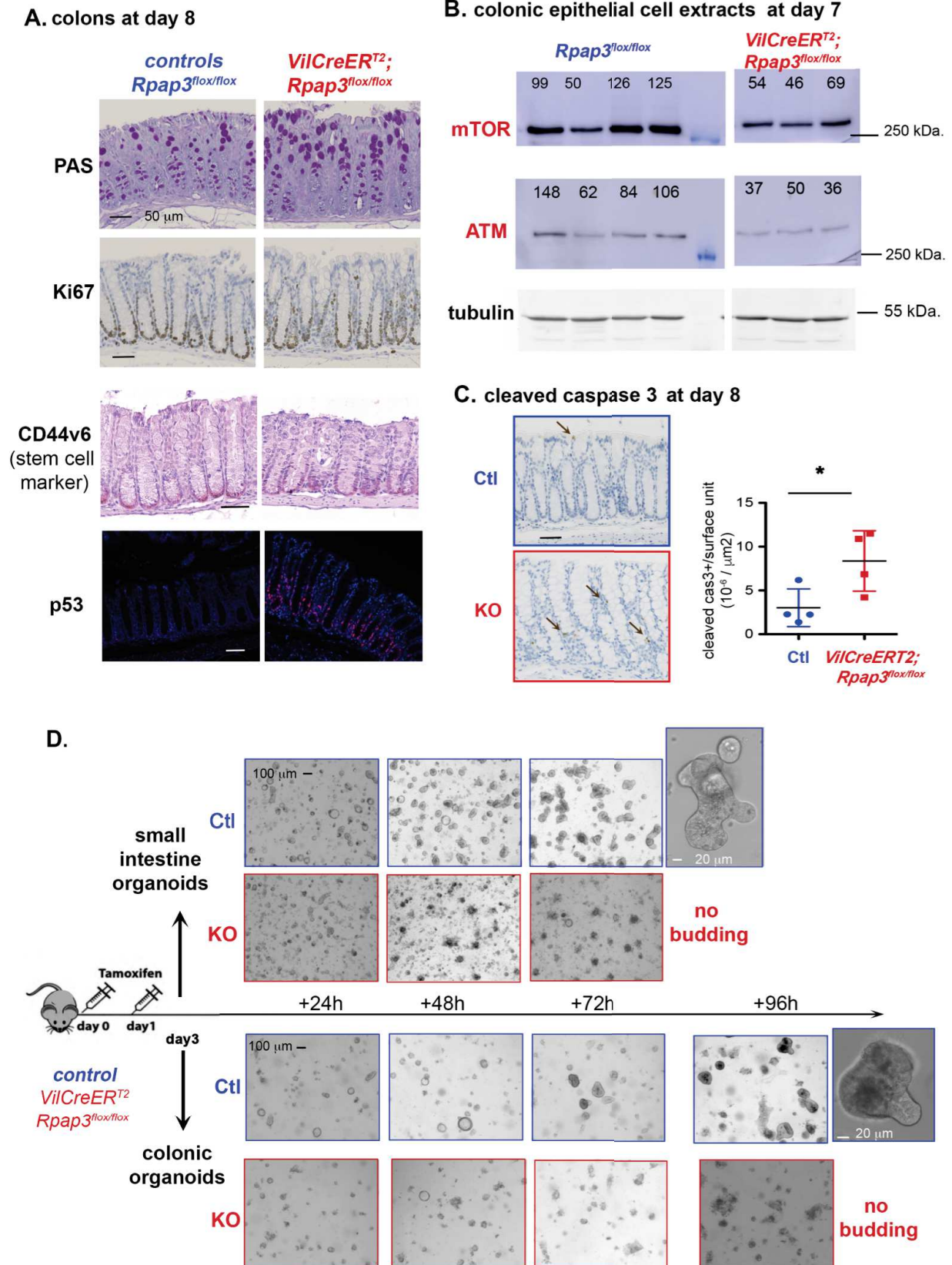


Figure 7: R2TP invalidation in the colon

(A) Representative micrographs of colon sections stained by periodic acid Schiff stain (PAS: labeling of goblet cell), IHC for Ki67 and CD44v6 (a marker of the colonic stem cells) and IF for p53, in controls *Rpap3^{fllox/fllox}* (left) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (right) at day 8 (n=4). Scale bars are 50 μm .

(B) Western blot analysis of colonic epithelial cells from animals, sacrificed 7 days after the first tamoxifen injection. mTOR, ATM and tubulin were detected with specific antibodies. Quantification of the signal ratios are indicated on top of each lane (average for the control ratios was arbitrarily set to 100). Each lane was loaded with the lysate obtained from one animal of the indicated genotype (6 animals per gel). Molecular weights are indicated on the right.

(C) Micrographs are tissue sections stained by IHC for cleaved caspase 3 in *Rpap3^{fllox/fllox}* and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice at day 6 (n=4). Total number of apoptotic cells at day 8 per surface (μm^2) of the jejunum for each mouse analyzed. Mean values with S.E.M are indicated for each experimental group. Unpaired two-tailed t-test with Welch's correction indicates significant difference between controls and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* animals (p=0.0468, t=2.625, df=5). Scale bar is 50 μm .

(D) Picture of organoids cultures. Crypts from small intestine (top) and colon (bottom) were prepared from *Rpap3^{fllox/fllox}* and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice 3 days after tamoxifen injection (n=3). Identical number of crypts were seeded and organoids culture were monitored every day. Organoids from control animals started budding after 72h in culture for small intestine crypts and 96h for colonic crypts. Organoids generated from *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* animals degenerated in culture before budding. Scale bar is 100 μm for all pictures and 20 μm for organoid insets.

Figure 8

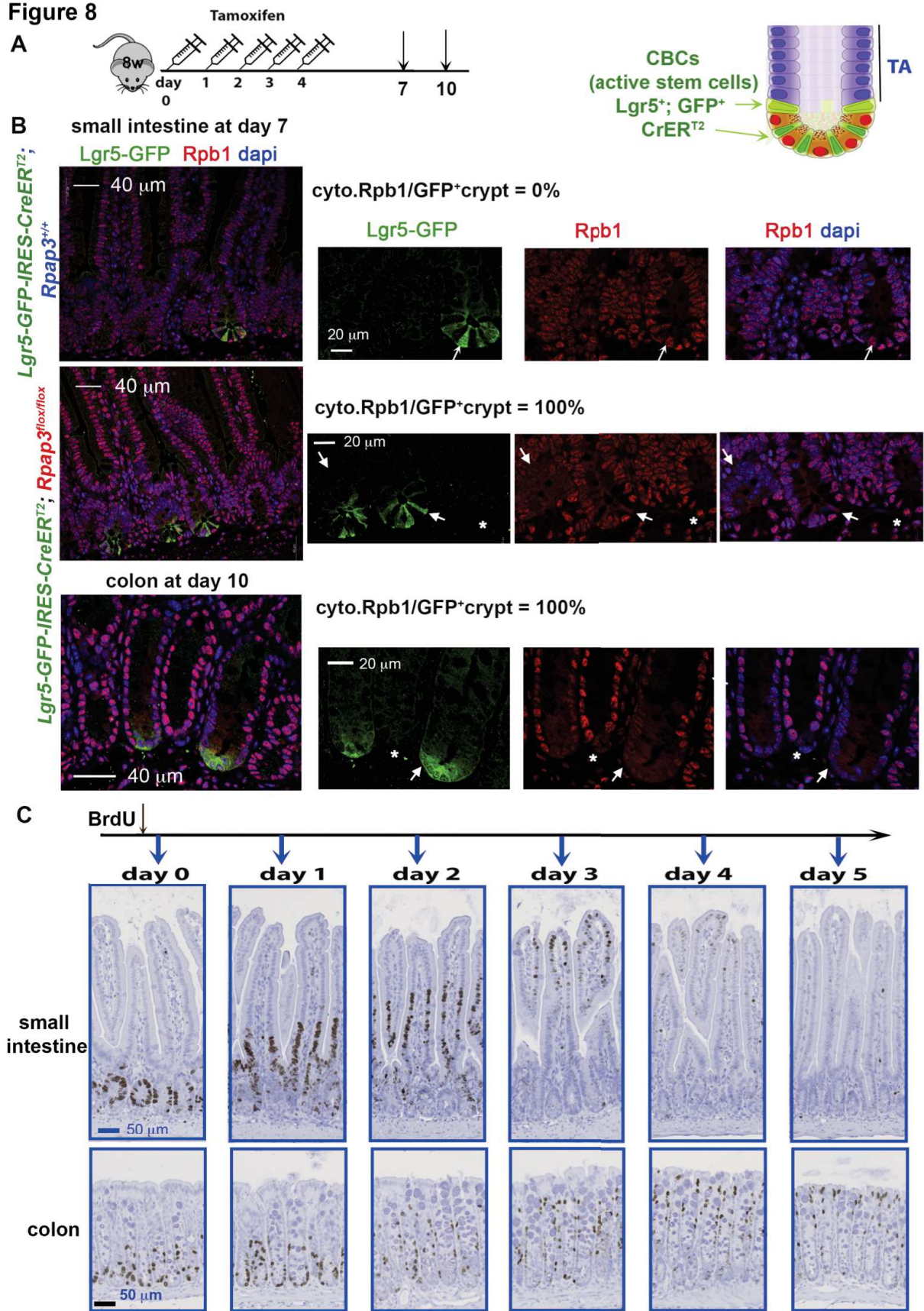


Figure 8: Cytoplasmic accumulation of Rpb1 in *RPAP3* KO crypts correlates with cellular turnover

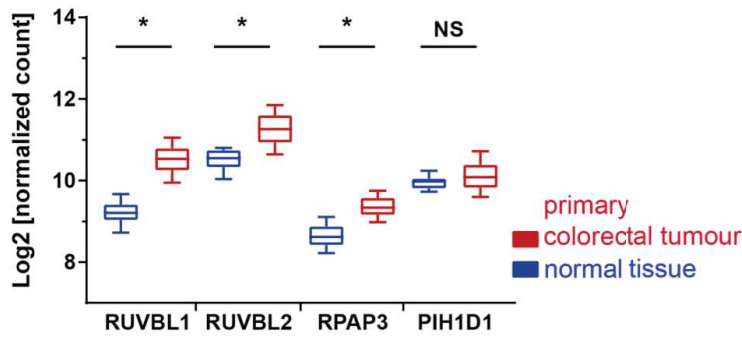
(A) Schematic representation of the experimental setting. Eight-week-old *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* mice received five sequential intra-peritoneal injections of tamoxifen and were analyzed 7 or 10 days after the first injection. In this genetic model, the Cre is expressed in the *Lgr5*⁺ CBC stem cells labeled by GFP (see scheme on the right).

(B) Representative images of tissue sections labelled by immunofluorescence with antibodies against GFP (green) and Rpb1 (red), with dapi counter-staining of nuclei (blue). Please note the mosaic expression of GFP. White arrow: GFP⁺ crypts. Asterisks: GFP⁻ crypts. At day 7, control *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{+/+}* animals do not show detectable Rpb1 signal in the cytoplasm (0/29 GFP⁺ and 0/96 GFP⁻ crypts; n=2). In the jejunum of *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals (n=3), GFP⁺ crypts show detectable Rpb1 signal in the cytoplasm (50/50). In contrast, adjacent GFP⁻ crypts, which do not express CreER^{T2}, do not show cytoplasmic Rpb1 staining (0/136, white asterisk). At day 10, in the colons of *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{lox/lox}* animals (n=2), Rpb1 is detected in the cytoplasm of CBC stem cells and progenitors in the GFP⁺ crypts (white arrow; 11/11). In contrast, Rpb1 was strictly nuclear in the neighboring GFP⁻ crypts (white asterisk, 0/15). Scale bars are identical for matching panels.

(C) Images are intestine tissue section of wild-type animals stained for BrdU. Animals received one BrdU injection and were sacrificed at the indicated time point. Scale bars are identical in each row. The experiment was repeated twice (2 to 4 animals/time-point/ experiment).

Figure 9

A. R2TP mRNA levels in CR tumor tissues



B. Disease-free survival of CRC patients according to RPAP3 in CR tumor tissues

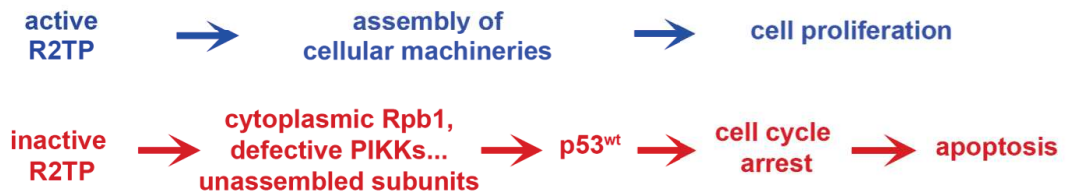
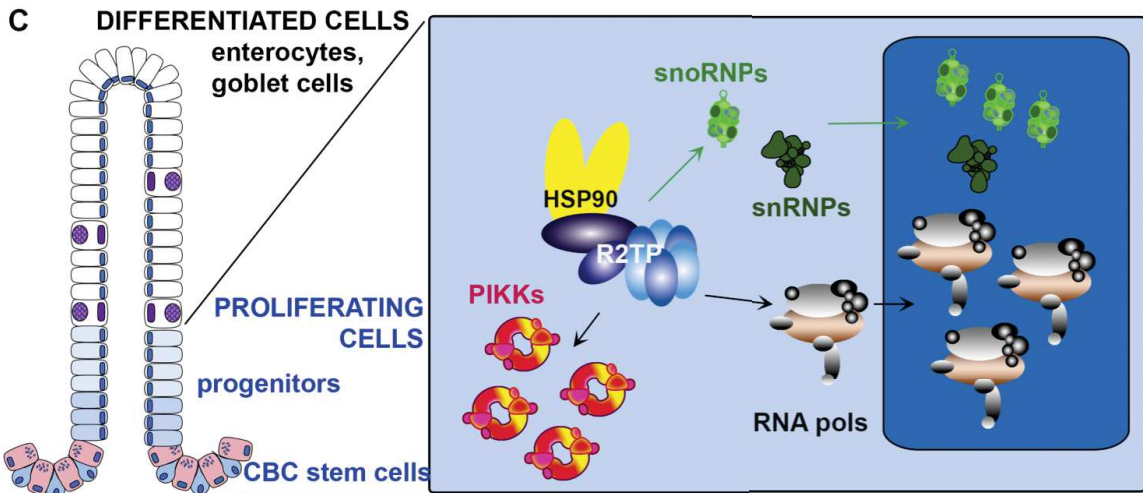
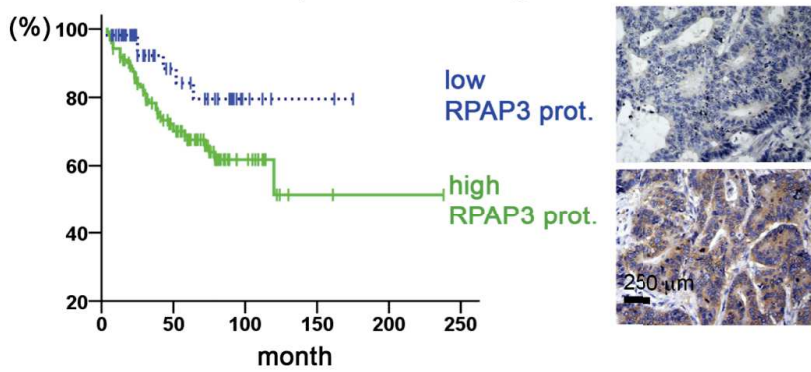


Figure 9: R2TP expression correlates with pathological cell proliferation.

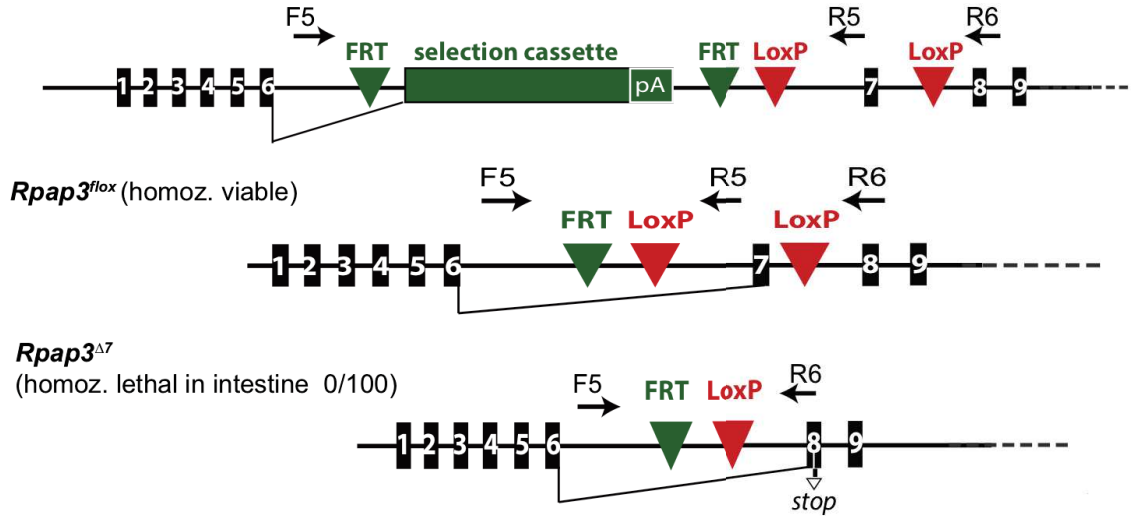
(A) The graph depicts transcript levels of R2TP components in human primary colorectal tumor samples (n = 380; COADREAD cohort), as compared to normal solid tissues (n = 51). y-axis: Log2 normalized counts for the indicated transcript. Distributions are presented as box-and-whisker plots (center line: median; box limits, first and third quartiles; whiskers, 10th and 90th percentiles). Statistical significance was determined by one-way ANOVA (*: $P < 0.001$).

(B) Kaplan–Meier analysis of disease-free survival among 177 CRC patients according to the proportion of RPAP3-expressing cells in tumor tissues ($C, P = 0.037$). Solid green line and dashed blue line indicate High and Low proportion of RPAP3-expressing tumoral cells, respectively. Right panels show examples of CRC tissues with low (top) or high (bottom) RPAP3 expression.

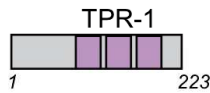
(C) Proposed model for R2TP activity in the small and large intestine. R2TP assembles cellular machineries such as RNA polymerases, snoRNPs, snRNPs and PIKKs-complexes in CBCs and progenitors in the proliferative compartment (blue cells). Differentiated cells (including Paneth cells from the small intestine crypts, in pink) mostly rely on the complexes assembled during the proliferative phase. A defect in R2TP activity induces client dysfunction, cell cycle arrest and apoptosis *via* p53, and eventually, epithelium degradation.

Supplementary Figure 1

A. *RPAP3^{wtsi}* (homoz. lethal: 0/34)



B. *Rpap3^{wtsi} -> Rpap3^{wtsi}*



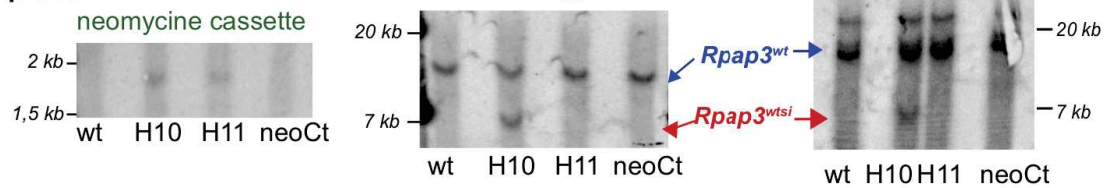
Rpap3^{fl} -> Rpap3^{wt}



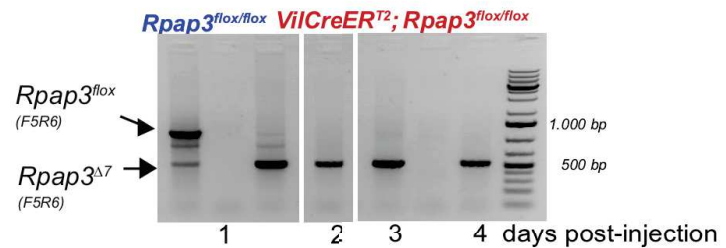
Rpap3^{Δ7} mRNA predicted to be unstable

no predicted protein

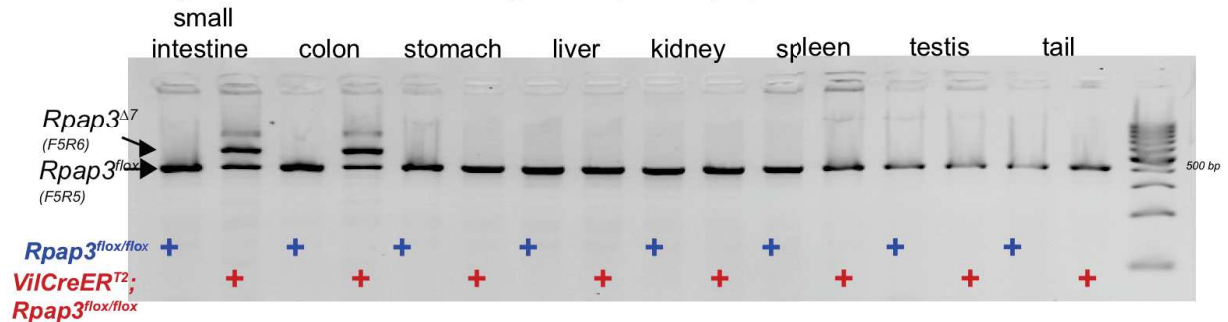
C. Southern blot from ES cell



D. PCR on genomic DNA from intestinal epithelial cells primers (F5, R6)



E. PCR on genomic DNA from tissue fragments - primers (F5, R5, R6) 4 days post-injection



Supplementary Figure 1: Targeting *Rpap3* in the murine intestinal epithelium

(A) Schematic representation of the different *Rpap3* alleles described in this paper. Black boxes represent the 9 first exons in *Rpap3* murine gene with numbering above. Green and red forms represent the inserted elements : green triangles for FLP recombination sequences, green box represents the selection cassette containing the β -galactosidase ORF and the poly-adenylation site (pA), red triangles indicate the *LoxP* sites. Black arrows represent the primers used for genotyping.

(B) *Rpap3* proteins encoded by the above-described alleles with domains and amino acid numbering in italic.

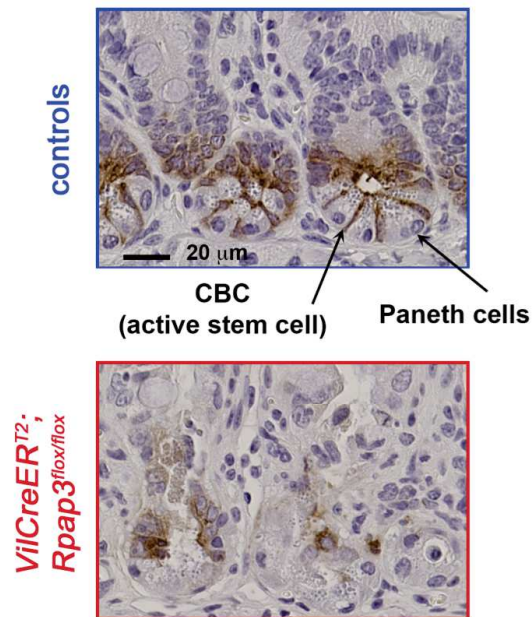
(C) Southern blot of genomic DNA showed a correct and unique recombination of the *wtsti* construct at the *Rpap3* locus in the KOMP ES clone H10 but not in H11. Molecular sizes are indicated on the side of the pictures.

(D) PCR on genomic DNA from small intestine epithelial cells shows that recombination occurs as early as one day after tamoxifen injection in the *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice, and persists up to 4 days (amplification of a band corresponding to *Rpap3^{Δ7}*). PCR with primers F5, R5, on genomic DNA from *Rpap3^{fllox/fllox}* mice intestinal epithelial cells amplifies a band corresponding to the floxed, unrecombined *Rpap3* allele. Molecular sizes are indicated on the right.

(E) PCR with primers F5, R5, R6 on genomic DNA from organs shows that recombination occurs only in the small intestine and the colon (upper band corresponding to *Rpap3^{Δ7}*), but not in the other organs of *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mouse treated with tamoxifen. Lower band corresponds to unrecombined *Rpap3^{fllox}* allele. Note that extracts were prepared from total small intestine and colon tissues, while recombination is restricted to the epithelia. Molecular sizes are indicated on the right.

Supplementary Figure 4

A. *Olfm4* at day 7

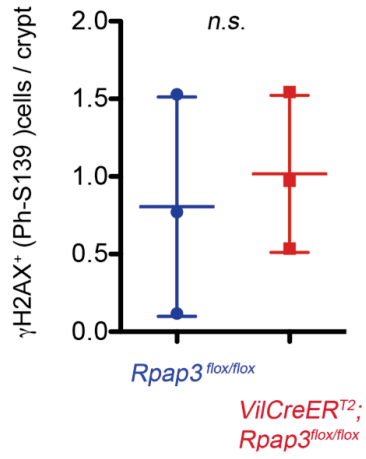


Supplementary Figure 4: Invalidation of *Rpap3* induces p53 stabilization

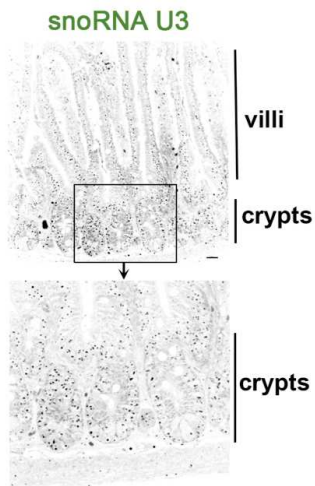
(A) Enlarged fields from the images in Figure 3 (A) revealing Olfm4 staining in crypts of the jejunum from control and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{flax/flax}* littermates, at day 7. Scale is identical for the two pictures.

Supplementary Figure 5

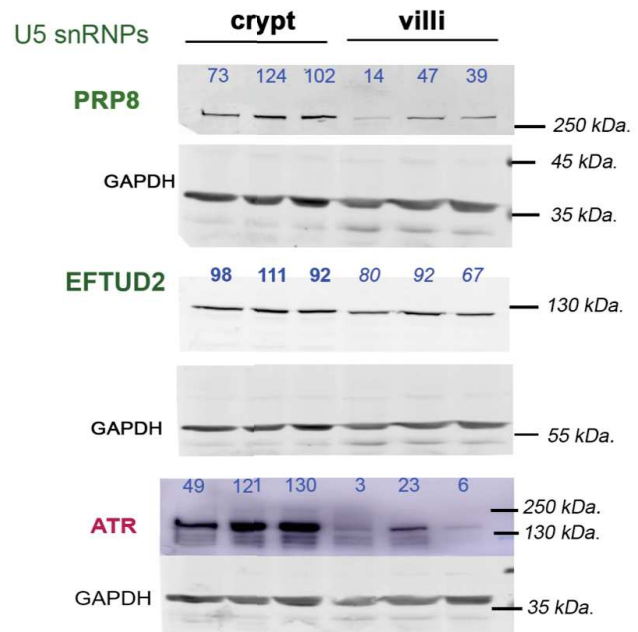
A



B



C



Supplementary Figure 5: R2TP substrates are concentrated in small intestinal crypts.

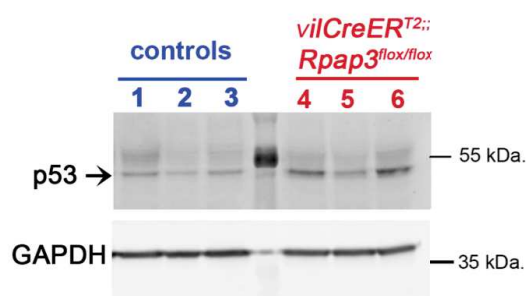
(A) Graph shows quantification of the DNA-damage marker γ -H2AX in the small intestine from control and *VilCreER^{T2} Rpap3^{lox/lox}* mice at day 6 (n=3).

(B) Micrographs are tissue sections stained for the snoRNA U3, an essential box C/D snoRNA, by FISH, in the crypts from controls animals (top) and inset magnification (bottom). Scale bar is 20 μ m.

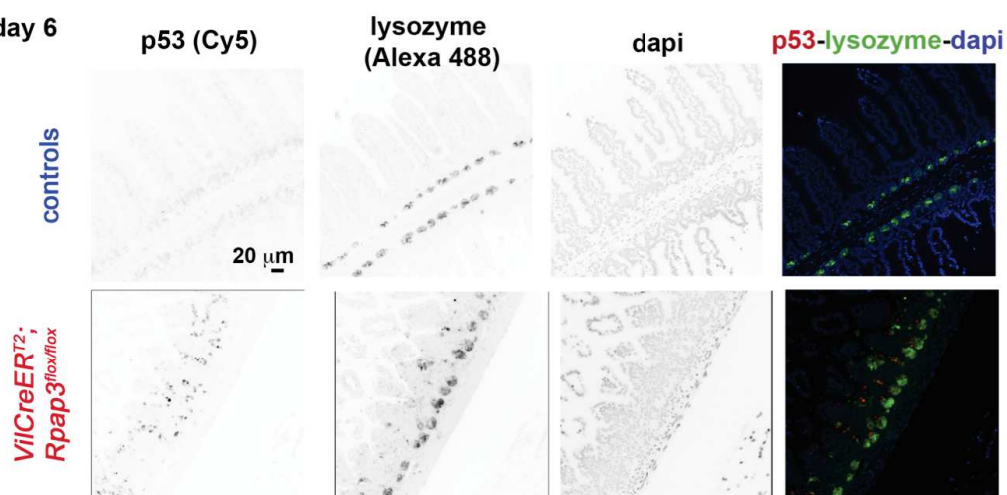
(C) Western blot of intestinal epithelial lysates extracted from crypt or villi from 3 control mice are shown. Western blots were probed with anti-PRP8, EFTUD2, ATR and GAPDH as a loading control. Quantification of the signal ratios are indicated on top of each lane (average for the crypt ratios was arbitrarily set to 100). Molecular weights are indicated on the right.

Supplementary Figure 6

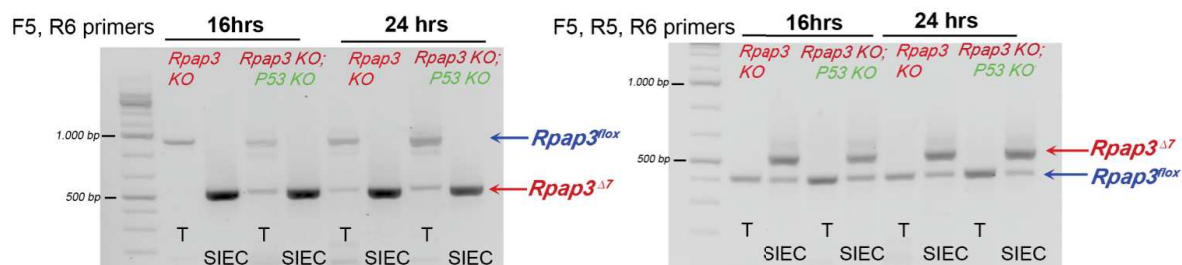
A. Western Blot at day 6



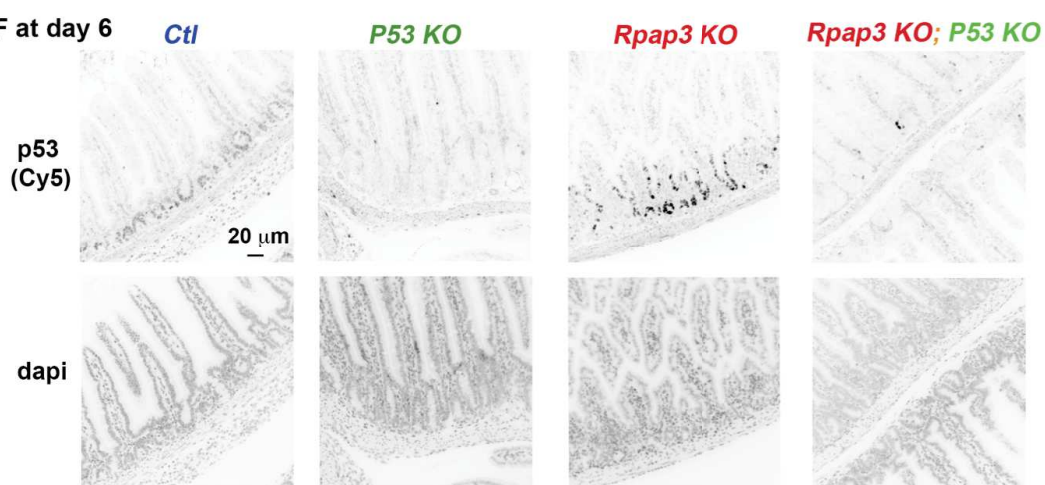
B. IF at day 6



C. PCR on genomic DNA from tail (T) and small intestine epithelial cells (SIEC)



D. IF at day 6



Supplementary Figure 6: R2TP invalidation triggers a p53 checkpoint

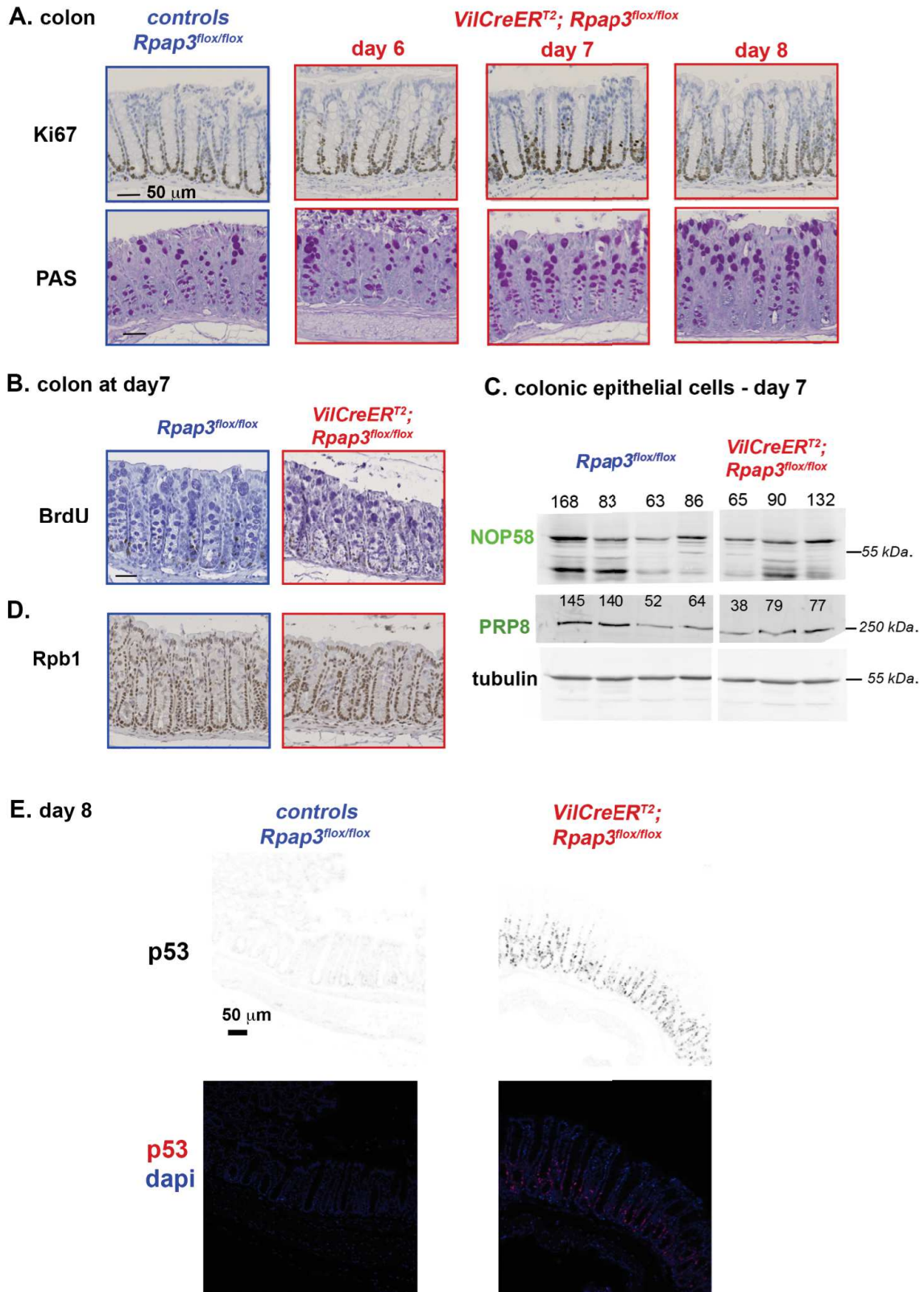
(A) Western blot analysis of p53 levels in the lysates of crypt cells from *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* animals, as compared to control littermates. Each lane represents lysates prepared from one animal with the indicated genotype. GAPDH was used as a loading control. Molecular weights are indicated on the right. Animals belong to a different experiment than those used to monitor p53 by IF, presented in Figure 5A.

(B) Micrographs are tissue sections stained by immunofluorescence for p53 (Cy5, red) and lysozyme, a marker of Paneth cells (Alexa 488, green) in controls (top) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (bottom) at day 6 (n=4). Dapi (blue): nuclei.

(C) PCR with primers F5, R6 (left) and F5, R5, R6 (right) on genomic DNA from tails (T) and small intestine epithelial cells (SIEC), extracted from single *Rpap3 KO (VilCreER^{T2}; Trp53^{fllox/+}; Rpap3^{fllox/fllox})* or double *Rpap3 KO; P53 KO (VilCreER^{T2}; Trp53^{fllox/fllox}; Rpap3^{fllox/fllox})* mice, 16 hrs or 24 hrs following tamoxifen injection. Bands corresponding to unrecombined, *Rpap3^{fllox}* and recombined *Rpap3^{Δ7}* alleles are indicated by blue and red arrows, respectively (see Supplementary Fig. 1 for a schematic representation of the primers used). Molecular sizes are indicated on the left.

(D) Micrographs are tissue sections stained by immunofluorescence for p53 (Cy5) in control, *P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/+}; Trp53^{fllox/fllox})*, *Rpap3 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}; Trp53^{fllox/+})* and double *Rpap3 KO; P53 KO (VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}; Trp53^{fllox/fllox})* mice at day 6 (representative of n=3 each single KO, n=7 double KO, from two different experiments). DAPI stained nuclei. Scale bar is shown in control, p53 picture. Note that the faint signal in crypts from control animals is absent in single *P53* and double *RPAP3 P53 KO*s animals.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7: R2TP invalidation in the colon

(A) Micrographs are colon sections stained by PAS and IHC for Ki67 in controls *Rpap3^{fllox/fllox}* (left) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* littermates (right) at day 6, 7, 8 after the first tamoxifen injection. Scale bar is identical for all figures. Each panel is representative of n=8-12 animals from three independent experiments.

(B) IF for BrdU in controls *Rpap3^{fllox/fllox}* (left) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (right) at day 7 (n=3). Scale bar is identical as in (A).

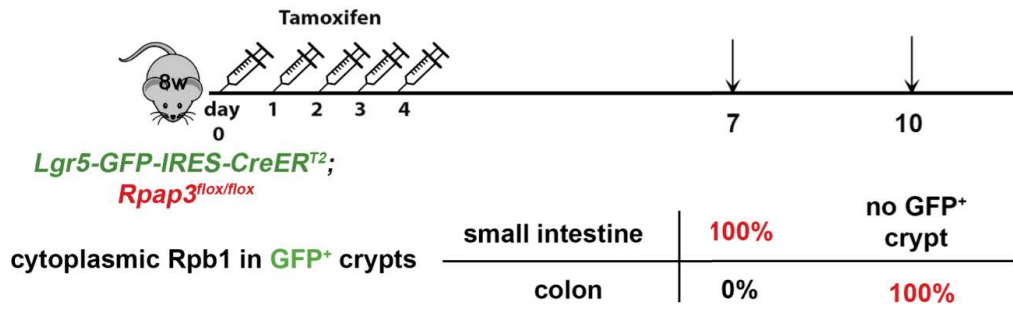
(C) Western blot analysis of preparations enriched for colonic epithelial cells from animals, sacrificed 7 days after the first tamoxifen injection. NOP58, PRP8 and tubulin were detected with specific antibodies. Quantification of the signal ratios are indicated on top of each lane (average for the control ratios was arbitrarily set to 100). Each lane was loaded with the lysate obtained from one animal of the indicated genotype. Molecular weights are indicated on the right.

(D) IHC for Rpb1 in controls *Rpap3^{fllox/fllox}* (left) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (right) at day 7 (n=4). Scale bar is identical as in (A, B).

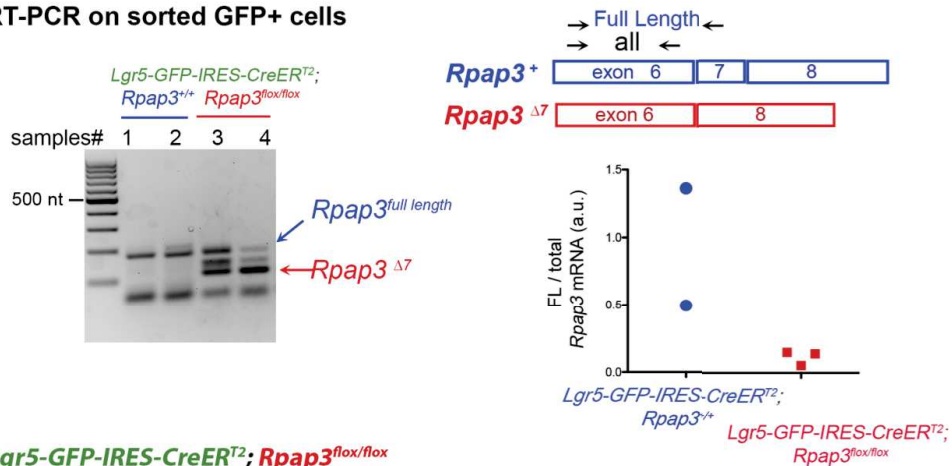
(E) Micrographs are colon sections stained by IF for p53 in controls *Rpap3^{fllox/fllox}* (left) and *VilCreER^{T2}; Rpap3^{fllox/fllox}* mice (right) at day 6, 8 (n=3). Bar are identical for all pictures.

Supplementary Figure 8

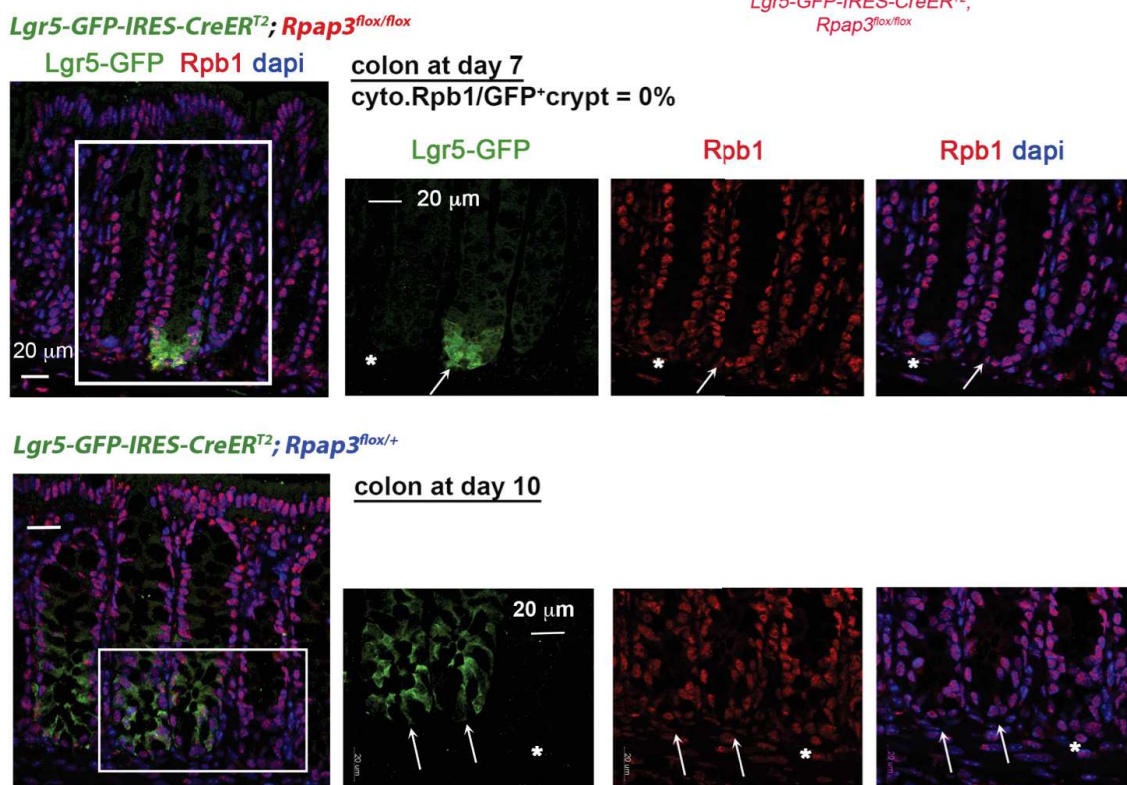
A



B. RT-PCR on sorted GFP⁺ cells



C



Supplementary Figure 8: Cytoplasmic accumulation of Rpb1 in *Rpap3* KO crypts correlates with cellular turnover.

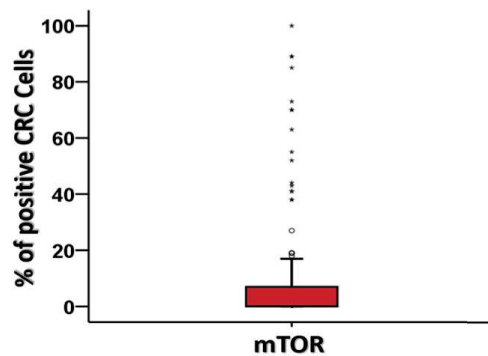
(A) Experimental setting in the mosaic model *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{lox/lox}*.

(B) RT-PCR on sorted GFP⁺ intestinal epithelial cells from *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{+/+}* (controls, lanes #1, 2) and *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{lox/lox}* (lanes# 3, 4) mice. (left) Amplicons specific for *Rpap3^{Δ7}* mRNA are amplified in cDNAs from *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{lox/lox}* samples but not from *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{+/+}* controls. Molecular marker is indicated on the left. (right) Schematic representation of primer pairs discriminating between full length, wt *Rpap3* cDNAs (“Rpap3⁺”) or both full length and recombined *Rpap3^{Δ7}* (“wt+Δ7”). RT-qPCR ratios of amplicons corresponding to full length *Rpap3^{wt}* mRNA on all *Rpap3* mRNAs (full length or Δ7) in cDNAs from *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{+/+}* controls and *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; RPAP3^{lox/lox}* animals.

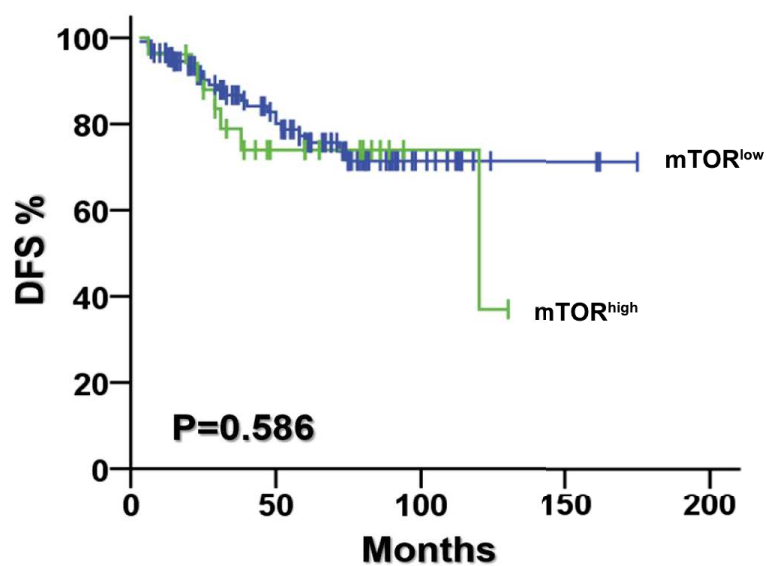
(C) Analysis of the colons from *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{lox/lox}* animals at day 7 showed that neither crypts with a detectable GFP signal (white arrows) nor adjacent GFP⁻ crypts (asterisk) displayed Rpb1 accumulation in the cytoplasm (0/19 and 0/21, respectively, in n=3 animals). Colons of *Lgr5-GFP-IRES-CreER^{T2}; Rpap3^{lox/+}* control animals did not show any detectable cytoplasmic accumulation of Rpb1 (red) in their GFP⁺ crypts (0/17) nor GFP⁻ crypts (0/20).

Supplementary Figure 9

A



B



Supplementary Figure 9:

(A) Box-and-whisker diagram of the mTOR distribution in CRC cases (n=149). The upper and lower ends of the box represent 75th and 25th percentiles. The median value is shown with a solid line.

(B). Correlation of mTOR expression with patient outcome. Kaplan-Meier disease-free survival (DFS) analysis among 149 CRC patients according to the expression of mTOR in tumor tissue (p=0.586). The solid green line and dashed blue line indicate CRC cases with mTOR^{high} and TOR^{low}, respectively.

Supplemental Table 1. RPAP3 Status According to Clinicopathological Features of CRC Patients (n = 177)

Variable	RPAP3		P
	Low: n (%)	High: n (%)	
Age			
< 60	8 (14.8)	22 (17.9)	0.827
≥ 60	46 (85.2)	101 (82.1)	
Gender			
Male	32 (59.3)	79 (64.2)	0.613
Female	22 (40.7)	44 (35.8)	
Tumor Location			
Colon	49 (90.7)	106	0.467
Rectum	5 (9.3)	17 (13.8)	
Histologic Type			
Adenocarcinoma	37 (68.9)	105 (85.7)	*0.025
Mucinous adenocarcinoma	14 (26.7)	12 (9.8)	
ring cell/undifferentiated carcinoma	3 (4.4)	6 (4.5)	
Tumor Grade			
1	4 (7.4)	12 (9.8)	0.779
2-3	50 (92.6)	111	
“T” classification			
T1	0 (0.0)	7 (5.7)	0.107
T2	18 (33.3)	55 (44.7)	
T3	35 (64.8)	59 (48.0)	
T4	1 (1.9)	2 (1.6)	
Stage			
I	18 (33.3)	62 (50.4)	*0.049
II	36 (66.7)	61 (49.6)	
Ki-67			
Negative	32 (59.2)	79 (64.2)	0.585
Positive	22 (40.8)	44 (35.8)	
Tumor Relapse			
Absent	48 (88.9)	84 (68.3)	*0.003
Present	6 (11.1)	39 (31.7)	
Patients’ Survival Status			
Alive	49 (90.7)	95 (77.2)	*0.036
Dead	5 (9.3)	28 (22.8)	

* Statistically significant values (p < 0.05)

Supplemental Table 2. Multivariate analysis of RPAP3 expression in CRC tumors (n = 177)

Variable	H R	95% CI	P
Disease-free survival			
Gender (Male vs Female)	1	0.6-	0.736
	.1	2.1	
Tumor Location (Rectal vs Colon)	1	0.9-	0.091
	.9	4.0	
Tumor Grade (2-3 vs 1)	1	0.4-	0.823
	.2	3.8	
Tumor Stage (II vs I)	2	1.2-	0.01
	.3	4.5	2*
RPAP3 (High vs Low)	2	1.2-	0.02
	.7	6.5	3*
Overall Survival			
Gender (Female vs Male)	1	0.5-	0.885
	.1	2.2	
Tumor Location (Rectal vs Colon)	1	0.5-	0.520
	.4	3.7	
Tumor Grade (2-3 vs 1)	1	0.3-	0.835
	.2	5.0	
Tumor Stage (II vs I)	2	0.9-	0.089
	.0	4.3	
RPAP3 (High vs Low)	2	0.8-	0.133
	.1	5.5	

*Statistically significant

Supplemental Table 3. Patients and Tumor Characteristics (n = 177)

Variable	Value (%)
Age at diagnosis (yr)	
Median	70.0
Range	36 - 90
Gender	
Male	111 (62.7)
Female	66 (37.3)
Tumor Location	
Colon	155 (87.6)
Rectal	22 (12.4)
Tumor Stage	
I	80 (45.2)
II	97 (54.8)
Pathological Differentiation	
Well	16 (9.0)
Moderate	148 (83.7)
Poor	13 (7.3)
RPAP3	
Low	54 (30.5)
High	123 (69.5)

References

1. Zhao, R. *et al.* Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone. *Cell* **120**, 715–727 (2005).
2. Schopf, F. H., Biebl, M. M. & Buchner, J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 345–360 (2017).
3. Coulombe, B., Bertrand, E. & Houry, W. A. PAQosome: An R2TP-based chaperone for quaternary structure formation. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 4–9 (2018).
4. Hořejší, Z. *et al.* Phosphorylation-dependent PIH1D1 interactions define substrate specificity of the R2TP cochaperone complex. *Cell Rep.* **7**, 19–26 (2014).
5. Pal, M. *et al.* Structural Basis for Phosphorylation-Dependent Recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Struct. Lond. Engl.* **1993** (2014).
6. Henri, J. *et al.* Deep Structural Analysis of RPAP3 and PIH1D1, Two Components of the HSP90 Co-chaperone R2TP Complex. *Struct. Lond. Engl.* **1993** (2018).
7. Zhou, C. Y. *et al.* Regulation of Rvb1/Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones. *Cell Rep.* **19**, 2033–2044 (2017).
8. Zaarur, N. *et al.* RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils. *EMBO J.* **34**, 2363–2382 (2015).
9. Martino, F. *et al.* RPAP3 provides a flexible scaffold for coupling HSP90 to the human R2TP co-chaperone complex. *Nat. Commun.* 1–13 (2018).
10. Maurizy, C. *et al.* The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones. *Nat. Commun.* 1–16 (2018).
11. Muñoz-Hernández, H. *et al.* Structural mechanism for regulation of the AAA-ATPases RUVBL1-RUVBL2 in the R2TP co-chaperone revealed by cryo-EM. *Sci. Adv.* **5**, eaaw1616 (2019).
12. Jha, S. & Dutta, A. RVB1/RVB2: Running Rings around Molecular Biology. *Mol. Cell* **34**, 521–533 (2009).
13. Zhao, R. *et al.* Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J. Cell Biol.* **180**, 563–578 (2008).
14. Boulon, S. *et al.* The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J. Cell Biol.* **180**, 579–595 (2008).
15. Bizarro, J. *et al.* NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res.* (2015).
16. Malinová, A. *et al.* Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* **216**, 1579–1596 (2017).
17. Cloutier, P. *et al.* R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with

- ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
18. Boulon, S. *et al.* HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **39**, 912–924 (2010).
 19. Cloutier, P. & Coulombe, B. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **88**, 211–221 (2010).
 20. Hořejší, Z. *et al.* CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to τ Y 2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol. Cell* **39**, 839–850 (2010).
 21. Boulon, S., Bertrand, E. & Pradet-Balade, B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biol.* **9**, 148–154 (2012).
 22. Goto, G. H. *et al.* Two separate pathways regulate protein stability of ATM/ATR-related protein kinases Mec1 and Tel1 in budding yeast. *PLoS Genet.* **13**, e1006873 (2017).
 23. Kakihara, Y., Makhnevych, T., Zhao, L., Tang, W. & Houry, W. A. Nutritional status modulates box C/D snoRNP biogenesis by regulated subcellular relocalization of the R2TP complex. *Genome Biol.* **15**, 404 (2014).
 24. Benbahouche, N. E. H. *et al.* Drosophila Spag is the homolog of RNA polymerase II-associated protein 3 (RPAP3) and recruits the heat shock proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the assembly of cellular machineries. *J. Biol. Chem.* **289**, 6236–6247 (2014).
 25. Grad, I. *et al.* The Molecular Chaperone Hsp90 α Is Required for Meiotic Progression of Spermatocytes beyond Pachytene in the Mouse. *PloS One* **5**, e15770 (2010).
 26. Voss, A. K., Thomas, T. & Gruss, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* **127**, 1–11 (2000).
 27. Vermeulen, L. & Snippert, H. J. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat. Publ. Group* **14**, 468–480 (2014).
 28. Barker, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 19–33 (2013).
 29. Kranz, A. *et al.* An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase. *genesis* **48**, 512–520 (2010).
 30. El Marjou, F. *et al.* Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *genesis* **39**, 186–193 (2004).
 31. van Es, J. H. *et al.* A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1918–1927 (2012).
 32. Koch, S. Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differ. Res. Biol. Divers.* **97**, 1–8 (2017).
 33. van der Flier, L. G., Haegebarth, A., Stange, D. E., van de Wetering, M. & Clevers, H.

OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* **137**, 15–17 (2009).

34. Hoter, A., El-Sabban, M. E. & Naim, H. Y. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).

35. Lemm, I. *et al.* Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3221–3231 (2006).

36. Takai, H., Wang, R. C., Takai, K. K., Yang, H. & de Lange, T. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell* **131**, 1248–1259 (2007).

37. Izumi, N., Yamashita, A., Hirano, H. & Ohno, S. Heat shock protein 90 regulates phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase family proteins together with the RUVBL1/2 and Tel2-containing co-factor complex. *Cancer Sci.* **103**, 50–57 (2012).

38. Hurov, K. E., Cotta-Ramusino, C. & Elledge, S. J. A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability. *Genes Dev.* **24**, 1939–1950 (2010).

39. Kaizuka, T. *et al.* Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.* **285**, 20109–20116 (2010).

40. Schwitalla, S. *et al.* Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer Cell* **23**, 93–106 (2013).

41. Afify, A., Durbin-Johnson, B., Viridi, A. & Jess, H. The expression of CD44v6 in colon: from normal to malignant. *Ann. Diagn. Pathol.* **20**, 19–23 (2016).

42. Guo, Y. *et al.* Cyclin A2 maintains colon homeostasis and is a prognostic factor in colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).

43. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).

44. Tetteh, P. W. *et al.* Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Stem Cell* **18**, 203–213 (2016).

45. Kim, S. G. *et al.* Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex. *Mol. Cell* **49**, 172–185 (2013).

46. Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N. & Meier, U. T. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA N. Y. N* **18**, 1833–1845 (2012).

47. Francipane, M. G. & Lagasse, E. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget* **5**, 49–66 (2014).

48. Muzny, D. M. *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).

49. Takai, H., Xie, Y., de Lange, T. & Pavletich, N. P. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev.* **24**, 2019–2030 (2010).
50. Gurley, K. E. & Kemp, C. J. Ataxia-telangiectasia mutated is not required for p53 induction and apoptosis in irradiated epithelial tissues. *Mol. Cancer Res. MCR* **5**, 1312–1318 (2007).
51. Gurley, K. E., Moser, R., Gu, Y., Hasty, P. & Kemp, C. J. DNA-PK suppresses a p53-independent apoptotic response to DNA damage. *EMBO Rep.* **10**, 87–93 (2009).
52. Stedman, A. *et al.* Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-mediated apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells. **22**, 1865–1876 (2015).
53. Sampson, L. L., Davis, A. K., Grogg, M. W. & Zheng, Y. mTOR disruption causes intestinal epithelial cell defects and intestinal atrophy postinjury in mice. *FASEB J.* **30**, 1263–1275 (2016).
54. Brandt, M. *et al.* mTORC1 Inactivation Promotes Colitis-Induced Colorectal Cancer but Protects from APC Loss- Dependent Tumorigenesis. *Cell Metab.* **27**, 118-135.e8 (2018).
55. Barlow, C. *et al.* Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159–171 (1996).
56. Ruzankina, Y. *et al.* Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell* **1**, 113–126 (2007).
57. Ruzankina, Y. *et al.* Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. *Nat. Genet.* **41**, 1144–1149 (2009).
58. Zhang, F. *et al.* Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **281**, 30036–30045 (2006).
59. Krastev, D. B. *et al.* A systematic RNAi synthetic interaction screen reveals a link between p53 and snoRNP assembly. *Nat. Cell Biol.* **13**, 809–818 (2011).
60. Moor, A. E. *et al.* Spatial Reconstruction of Single Enterocytes Uncovers Broad Zonation along the Intestinal Villus Axis. *Cell* **175**, 1156-1167.e15 (2018).
61. Chen, D. *et al.* Spaghetti, a homolog of human RPAP3 (RNA polymerase II-associated protein 3), determines the fate of germline stem cells in *Drosophila* ovary. *Cell Biol. Int.* **42**, 769–780 (2017).
62. Fierro-Monti, I. *et al.* Dynamic Impacts of the Inhibition of the Molecular Chaperone Hsp90 on the T-Cell Proteome Have Implications for Anti-Cancer Therapy. *PLoS One* **8**, e80425 (2013).
63. Echeverría, P. C., Bhattacharya, K., Joshi, A., Wang, T. & Picard, D. The sensitivity to Hsp90 inhibitors of both normal and oncogenically transformed cells is determined by the equilibrium between cellular quiescence and activity. *PLoS One* **14**, e0208287 (2019).
64. Pillarsetty, N. *et al.* Paradigms for Precision Medicine in Epichaperome Cancer Therapy. *Cancer Cell* **36**, 559-573.e7 (2019).

65. Rodina, A. *et al.* The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. *Nature* **538**, 397–401 (2016).
66. Vartholomaïou, E. *et al.* Cytosolic Hsp90alpha and its mitochondrial isoform Trap1 are differentially required in a breast cancer model. *Oncotarget* **8**, 17428–17442 (2017).
67. Vartholomaïou, E., Echeverra, P. C. & Picard, D. *Unusual Suspects in the Twilight Zone Between the Hsp90 Interactome and Carcinogenesis*. vol. 129 (Elsevier Inc., 2016).
68. Suman Chatterjee & Timothy Burns. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1978 (2017).
69. Neckers, L. & Workman, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 64–76 (2012).
70. Goldman, M. *et al.* The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/326470> (2018) doi:10.1101/326470.
71. Lattanzio, R. *et al.* Overexpression of activated phospholipase C γ 1 is a risk factor for distant metastases in T1-T2, N0 breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* **132**, 1022–1031 (2012).
72. Brown, T. Southern blotting. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 10**, Unit 10.6A (2001).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

HSP90 est une protéine chaperon essentielle impliquée dans le repliement et la stabilisation de protéines ayant un large éventail de fonctions cellulaires. Pour être régulé finement, HSP90 possède une multitude de co-chaperons. Le R2TP est un co-chaperon multi-protéique spécialisé dans l'assemblage et la maturation de complexes protéiques. Des études menées ces quinze dernières années ont permis de mettre en évidence l'implication du R2TP dans l'assemblage de machineries cellulaires comme les snoRNP, les snRNP U4 et U5, les ARN Polymérase ou encore des PIKK. De nombreuses études ont été menées récemment pour comprendre comment le R2TP et HSP90 prennent en charge ses différents complexes et participent à leur assemblage mais beaucoup de travail reste encore à accomplir. Au sein du R2TP, PIH1D1 est une sous-unité importante dans la reconnaissance des substrats. Son domaine PIH en NTER a une interaction directe avec certains substrats du R2TP. PIH1D1_NTER reconnaît et s'associe avec la protéine TEL2 qui est une protéine adaptatrice via un motif phosphorylé DSDD/E et ce même motif est présent dans certains substrats (*Hořejší, 2010*). Cependant, peu de clients du R2TP possèdent ce motif consensus ce qui suggère que PIH1D1 possède d'autres modes de reconnaissance des substrats. Identifier d'autres clients de PIH1D1 pourrait potentiellement permettre d'identifier d'autres séquences consensus reconnues et de comprendre comment PIH1D1 fonctionne dans sa reconnaissance des substrats du R2TP. Dans cet objectif, nous avons réalisé des analyses protéomiques sur des immunoprécipitations avec comme appât la protéine PIH1D1 entière mais aussi avec un fragment NTER contenant le domaine PIH1 seul. Afin d'identifier quelles sont les protéines utilisant la poche de reconnaissance du peptide phosphorylé dans ce domaine, une mutation d'un acide aminé, la lysine 64 en alanine a été générée dans le fragment NTER et aussi utilisé comme appât pour les analyses protéomiques.

Parmi les interactants de PIH1D1_NTER, il a été identifié les trois sous-unités du complexe TSC qui est un suppresseur de tumeur régulant la voie mTORC1 (*Malinová, 2017*). Nos analyses en protéomique en Label Free ont également mis en évidence l'association de PIH1D1 avec les sous-unités du complexe TSC, TSC1, TSC2 et TBC1D7. Cloutier *et al* avait trouvé ces sous-unités en association avec des prefoldines-like faisant partie du PAQosome (*Cloutier, 2017*). Ce complexe TSC est intéressant dans l'étude des clients de PIH1D1 car aucune des sous-unités ne possède de motif DSDD/E. De plus, c'est un complexe simple dont la fonction cellulaire est bien caractérisée. C'est donc un candidat idéal dans l'étude de la reconnaissance des substrats de PIH1D1 et du rôle du système HSP90/R2TP de ce dernier dans l'assemblage du complexe multi-protéique.

A. PIH1D1 : un facteur important du R2TP pour la reconnaissance des substrats

Il a été mis en évidence que le domaine NTER de PIH1D1 reconnaissait un motif DSDD/E sur ses substrats (Hořejší, 2010). Cette reconnaissance nécessite une phosphorylation de la sérine par la Caséine Kinase 2 (CK2). Sur PIH1D1, cela implique une poche qui contient deux acides aminés importants (Lys57 et Lys64) pour la reconnaissance de la sérine phosphorylée. La mutation de l'une ou l'autre des lysines entraîne la perte de reconnaissance de TEL2 (Hořejší, 2014). Comme pour TEL2, j'ai pu observer que les trois sous-unités du TSC s'associent très faiblement IP LUMIER avec le mutant du domaine NTER de PIH1D1 (NTER_K64A) et ne sont plus retrouvés comme partenaires spécifiques quand l'IP de ce domaine mutant est analysé en protéomique. Pourtant, une interaction de TSC1 et dans une moindre mesure TSC2 a été observée en IP LUMIER alors qu'aucune de ces deux protéines ne possède de motif DSDD/E. Cela suggère des modes de reconnaissance différents avec de nouveaux motifs dans TSC1 et TSC2 pouvant reconnaître la poche de liaison au phospho-peptide de PIH1D1_NTER. TSC1 est la sous-unité s'associant le plus fortement à PIH1D1 et son domaine NTER. Après un découpage de la protéine, des analyses en IP LUMIER, en double hybride et un test d'interaction *in vitro* ont permis d'établir que le domaine de dimérisation de TSC1 (TSC1-D3) est en association directe avec la poche NTER de PIH1D1. De plus, une analyse de phospho-protéomique n'a pas permis de trouver de peptides phosphorylés sur TSC1. Une expérience d'IP LUMIER utilisant un traitement à la lambda phosphatase a mis en évidence que l'interaction entre TSC1 et PIH1D1-NTER pouvait avoir lieu en absence de phosphorylation. Couplées aux données d'interactions *in vitro*, ces résultats suggèrent donc que l'interaction entre PIH1D1 et TSC1 n'est pas canonique et ne nécessite pas la phosphorylation du substrat comme dans le cas de TEL2 (Hořejší, 2014). A l'instar des protéines du complexe TSC, d'autres substrats de PIH1D1 ne sont pas reconnus via le motif consensus identifié sur TEL2. Il est donc possible que PIH1D1 reconnaisse plusieurs motifs via la poche de son NTER. Il sera intéressant dans les prochaines études d'analyser les peptides identifiés afin d'étudier si un ou plusieurs autres motifs consensus sont communs parmi les interactants de PIH1D1. La caractérisation d'un fragment de TSC1 (725-1047) produit dans *E. coli* qui soit soluble et qui interagisse *in vitro* avec PIH1D1_NTER pourra permettre l'étude structurale de la surface d'interaction et ainsi définir de nouvelles caractéristiques pour la reconnaissance des substrats par le domaine Nter de PIH1D1. Cette étude sera menée en collaboration avec X. Manival à Nancy.

Lors de l'analyse protéomique en Label-Free après purification des phospho-peptides sur colonne Tio2, beaucoup de phospho-peptides ont été identifiés pour l'IP PIH1D1_NTER par rapport à l'IP PIH1D1 entier. Même si TSC1 n'interagit pas de manière phospho-dépendante avec PIH1D1,

il est possible que la phosphorylation des clients joue un rôle dans la régulation de l'interaction avec PIH1D1_NTER ou avec les autres composants du R2TP. Dans notre étude, nous avons identifié plus de 2500 peptides et plus de 800 phospho-peptides pour l'IP PIH1D1_NTER. Parmi les 2500 peptides, plusieurs avaient déjà été identifiés en interaction avec PIH1D1 (*Hořejší, 2014*). Aucun des motifs phosphorylés connus n'a pu être trouvé dans notre étude. Cependant, nous avons identifié d'autres sites phosphorylés sur ces protéines. Là encore, il sera intéressant d'étudier les séquences des phospho-peptides afin de voir si des motifs consensus sont présents et si certains sont associés à des kinases particulières comme dans le cas du motif DSDD/E phosphorylé par la caséine kinase 2 (CK2). TSC2 présente trois peptides phosphorylés dont deux sont des sites connus de régulation de la protéine par AKT et MAPK2 (Ser 981 et Ser 1254 respectivement). Ces deux sites, une fois phosphorylés, vont être reconnus par la protéine 14-3-3 (*Miyazaki, 2010*). Même si le mécanisme de régulation de TSC2 par la protéine 14-3-3 n'est pas totalement bien compris, l'association des deux protéines semble toutefois déclencher l'inactivation du complexe TSC et donc l'activation de la voie mTORC1. Il a été montré que la protéine 14-3-3 agissait comme un régulateur des PI3K (*Bonnefoy-Berard, 1995*) et de FRAP (« *FKBP12-rapamycin-associated protein* ») (*Mori, 2000*). On peut donc imaginer qu'en condition de stress, le système HSP90/R2TP prenne en charge le complexe TSC afin de prévenir sa dégradation par 14-3-3.

B. Le complexe TSC : un mécanisme d'assemblage complexe

1. TBC1D7, une sous-unité à part

Cloutier *et al.* ont réalisé des purifications par affinité en tandem des trois-sous unités du TSC couplées à des analyses au spectromètre de masse (*Cloutier, 2017*). TSC1, TSC2 et TBC1D7 ont montré des interactions avec les sous-unités du complexe R2TP/PFDL ou PAQosome. Nous retrouvons TBC1D7 dans notre IP PIH1D1_NTER en protéomique mais dans les expériences d'IP LUMIER, TBC1D7 n'a montré aucune association spécifique avec les sous-unités du R2TP. Son association avec TSC1 et TSC2 a cependant été bien établie dans la littérature. Nakashima *et al.* ont d'abord caractérisé l'interaction de TBC1D7 avec le domaine « *Coiled-coil* » (CCD) de TSC1 avant de montrer qu'une sur-expression de TBC1D7 entraîne l'ubiquitinylation de TSC1 (*Nakashima, 2007*). La protéine RB1CC1 (« *RB1-inducible coiled-coil 1* »), un suppresseur de tumeur impliqué dans l'expression de RB1, interagit également avec le CCD de TSC1 pour induire sa dégradation par l'ubiquitine (*Chano, 2006*). On ne sait cependant pas si l'effet de la sur-activation de TBC1D7 est associée à RB1CC1. A contrario, en absence de TBC1D7, on observe une dissociation de TSC1-TSC2 (*Dibble, 2012*). La stoechiométrie du complexe TSC est très importante pour sa stabilité. 40% à 50% des protéines TBC1D7 de la cellule sont en complexe avec le TSC tandis que le reste

est libre dans la cellule. La forme libre va subir un « turn-over » important afin de toujours être dans une concentration adéquate pour ne pas dissocier le complexe TSC (*Dibble, 2012*). Il a été proposé que le sous-complexe TSC1-TBC1D7 serait la première étape de la formation du complexe TSC mature (*Cloutier, 2017*). Cependant, nos observations et l'étude de *Dibble et al.* montrent que TSC1 et TSC2 s'associent dans un premier temps avant que TBC1D7 ne vienne à son tour compléter le complexe TSC (*Dibble, 2012*). De plus, il a été montré que *in vivo* le sous-complexe TSC1-TBC1D7 est rare voire inexistant dans les cellules normales (*Dibble, 2012*).

2. TSC1 et TSC2 sont recrutés de manière indépendante sur le système HSP90/R2TP

Notre analyse s'est principalement concentrée sur l'association de TSC1 et TSC2 avec les composants du R2TP et entre elles. Nos premières données ne permettaient pas d'établir si TSC2 se liait directement sur le R2TP. En effet, les pourcentages de co-purification en IP LUMIER étant très faibles dans les IP PIH1D1, il est difficile de savoir si TSC2 s'associe au R2TP ou si l'interaction n'est dépendante que de l'association de TSC1 avec PIH1D1. Nous avons montré que les niveaux cellulaires de TSC1 et TSC2 étaient sensibles à l'inhibition de HSP90. *Woodford et al.* avaient déjà montré que TSC2 était un client de HSP90. Les auteurs avaient également identifié TSC1 comme un co-chaperon de HSP90 qui inhibait son activité. Il avait été proposé que TSC1 facilite le chargement de son partenaire TSC2 sur HSP90 (*Woodford, 2017*). Notre analyse en protéomique quantitative par IP SILAC montre que TSC2 interagit avec les sous-unités de HSP90 et HSP70 ainsi que les co-chaperons STIP1 et BAG2. De plus, nous avons pu montrer par IP LUMIER que HSP90 est nécessaire pour l'association de TSC2 avec RPAP3. En effet, lorsqu'on mute les domaines TPR de RPAP3 afin d'empêcher la fixation de HSP90, on a une diminution de l'interaction de ses domaines avec TSC2. Nous sommes donc arrivés à un modèle où PIH1D1 et RPAP3 vont prendre en charge les sous-unités TSC1 et TSC2 respectivement. La génération de cellules « *Knock out* » pour PIH1D1 par CRISPR/Cas9 nous a permis d'étudier les interactions en IP LUMIER dans des cellules où PIH1D1 est déplété. Nous avons observé que dans ces conditions, TSC1 et TSC2 interagissent moins l'une avec l'autre que dans des cellules contrôles. L'inhibition de l'activité ATPasique des RUVBL avec l'inhibiteur CB-6644 (*Assimon, 2019*) diminue également l'association de TSC1 avec TSC2. Cet effet n'est cependant pas cumulatif avec la déplétion de PIH1D1. Nous avons observé aussi que la déplétion de PIH1D1 entraîne une association plus forte de TSC2 avec RPAP3 en IP LUMIER et ceci est observé aussi avec RUVBL1 et RUVBL2 dans une moindre mesure. Nous avons aussi utilisé des cellules KO pour TSC1 pour montrer en IP LUMIER qu'en absence de TSC1, TSC2 continue à s'associer aux facteurs du R2TP. Cela montre que le

recrutement des deux sous-unités TSC1 et TSC2 sur le R2TP se fait de manière indépendante l'une de l'autre.

Les analyses structurales réalisées ces dernières années ont permis d'établir la stoechiométrie du complexe TSC. Deux études récentes ont montré que le complexe formait une structure « *scorpion-like* » constituée d'un corps central, d'une pince et d'une queue. Le corps est composé du dimère des domaines HEAT de TSC2 ainsi que du dimère du CCD de TSC1. La pince correspond au domaine NTER de TSC1 qui est très flexible tandis que la queue correspond au domaine CTER de TSC1 avec la zone de liaison à TBC1D7 (Yang, 2021 ; Ramlaul, 2021). L'association de TBC1D7 est importante pour la stabilisation du complexe TSC (Qin, 2016). Nos données suggèrent également que l'assemblage du complexe TSC, et plus précisément l'association de TSC1 avec TSC2, nécessite un R2TP fonctionnel. Mais à quelle étape de la formation du TSC le R2TP intervient-il ? S'associe-t-il avec les formes monomériques ou déjà dimériques des différentes sous-unités ? Joue-t-il un rôle dans leur dimérisation ? Si aujourd'hui la structure du complexe mature semble bien établie, les étapes intermédiaires d'assemblage ne sont pas connues. L'utilisation de mutants des protéines TSC qui ne se lient plus l'une avec l'autre ou qui ne forment plus de dimères pourrait permettre d'isoler ces intermédiaires et de les étudier. La localisation du complexe TSC est importante pour son activité (Menon, 2014). Le système HSP90/R2TP pourrait aussi jouer un rôle dans cette localisation. La localisation des sous-unités du TSC dans des cellules où le R2TP est inactivé, soit par KO, soit par des drogues pourra être étudiée par microscopie à fluorescence. L'expression de formes mutantes des sous-unités du TSC pourrait aussi conduire à des localisations aberrantes et permettre de comprendre le rôle de la localisation pour l'interaction avec le système HSP90/R2TP et la formation d'un complexe TSC mature.

C. Rôle de HSP90 de RPAP3 et des RUVBL dans le recrutement des substrats.

HSP90 régule un grand nombre de protéines y compris des kinases, des facteurs de transcriptions, des E3 ubiquitines ligases et des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Schopf, 2017 ; Radli and Rüdiger, 2018 ; Mayer and Le Breton, 2015 ; Röhl, 2013 ; Taipale, 2012). De nombreuses études ont montré le rôle de HSP90 dans des processus cellulaires essentiels comme l'apoptose, le contrôle du cycle cellulaire ou encore le repliement et la dégradation des protéines. La reconnaissance des clients va se faire via son association avec ses différents co-chaperons.

RPAP3 fait le lien entre le chaperon HSP90 et les autres composants du R2TP. Les domaines TPR de RPAP3 étaient connus pour permettre la liaison aux chaperons tels que HSP90 et HSP70

(Henri, 2018). Cependant la fonction des autres domaines de RPAP3 n'était pas encore connue. Les données de protéomique montrent que le domaine CTER de RPAP3 lie les protéines RUVBL1 et RUVBL2 mais également des substrats du R2TP tels que RPB1 qui est la grande sous-unité de l'ARN Pol II, SHQ1 impliqué dans l'assemblage des snoRNP H/ACA, NOP58 impliqué dans l'assemblage des snoRNP C/D et PRPF8 faisant partie des protéines cœurs de la snRNP U5 (Maurizy, 2018). Le domaine CTER lie également des co-facteurs du R2TP comme NOPCHAP1 (auparavant appelé C12ORF45), C2ORF44 et ZNHIT2. Une analyse structurale in vitro montre que RPAP3-CTER lie directement les RUVBL sous leur forme multimérique non liée à l'ATP (Maurizy, 2018). En mutant les acides aminés responsables de la liaison aux RUVBL1 et 2, les substrats identifiés précédemment sont également perdus (sauf SHQ1) montrant que l'interaction de RPAP3 avec les substrats dépend des RUVBL1/2. Cependant, le rôle de ces derniers au sein du R2TP reste encore incompris.

Notre laboratoire a montré que les composants du R2TP jouent des rôles spécifiques et complémentaires dans le recrutement et l'assemblage des complexes multi-protéiques. La biogénèse des snoRNP fait intervenir le R2TP dans les premières étapes de l'assemblage des snoRNP à boîte C/D. Les protéines cœurs telles que NOP58 et SNU113 sont des clientes de HSP90 et ont besoin chez l'homme des co-facteurs NOPCHAP1 et NUFIP respectivement pour être adressées au R2TP. Les RUVBL assurent ensuite la maturation et l'association de ses sous-unités avec le reste de leurs partenaires. Lors de la biogénèse des snoRNP à boîte H/ACA, PIH1D1 va reconnaître le sous-complexe DKC1-SHQ1 et l'adresser aux RUVBL afin qu'elles dissocient les deux protéines pour favoriser la maturation du snoRNP (Machado-Pinilla, 2012). Ce schéma d'assemblage correspond à celui que nous venons d'identifier pour le complexe TSC.

D. L'assemblage de la particule U5 : exemple d'une interaction canonique avec PIH1D1 mais stabilisée par le co-facteur ZNHIT2.

La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire caractérisée par une dystrophie rétinienne (Boon, 2007). La protéine PRPF8 est souvent retrouvée mutée ce qui crée un défaut d'assemblage de la snRNP U5 qui constitue le spliceosome conduisant à un défaut d'épissage sur les ARNm. L'analyse des protéines spécifiques de la particule U5 chez la levure *S. cerevisiae* a montré que ces protéines s'associaient dans le cytoplasme avant d'être importées dans le noyau pour rejoindre une particule contenant le pré-ARN U5 et les protéines Sm et finir sa maturation en particule U5 fonctionnelle (Boon, 2007). Nous avons étudié ces protéines dans les cellules

humaines et montré que les mêmes protéines spécifiques pouvaient aussi s'assembler en pré-complexe dans le cytoplasme avec l'aide du système HSP90/R2TP (*Malinová, 2017*). Quand une de ces protéines et notamment PRPF8, présente une mutation ou est manquante, le R2TP va retenir le pré-complexe dans le cytoplasme et jouer un rôle de contrôle de qualité. Pour cela, il va être secondé par ZNHIT2 qui va faire l'intermédiaire entre les protéines du snRNP U5 et les composants du R2TP afin d'adresser les clients au complexe co-chaperon (*Malinová, 2017*). Ce mécanisme d'action a déjà été décrit avec la protéine ECD permettant à PIH1D1 d'interagir stablement avec son substrat (*Claudius, 2014 ; Mir, 2015*). Cloutier *et al.* ont aussi identifié ZNHIT2 comme un co-facteur du R2TP jouant un rôle dans l'assemblage de U5 (*Cloutier, 2017*). EFTUD2, une autre protéine spécifique du snRNP U5, possède un motif stabilisateur DSDE reconnu par le domaine NTER de PIH1D1. Cependant, l'interaction entre PIH1D1_NTER et EFTUD2_DSDED n'est pas stable *in vivo* est nécessite l'intervention de ZNHIT2. Nous avons montré par SILAC IP qu'un mutant DADE de EFTUD2 n'est plus associé à la particule U5 ni au R2TP. Dans cette étude, nous proposons le modèle suivant: 1) les protéines spécifiques de U5 viendraient de manière indépendante s'associer au complexe HSP90/R2TP dans le cytoplasme ; 2) ZNHIT2 va reconnaître EFTUD2 et RUVBL1 permettant ainsi d'adresser la protéine cliente à PIH1D1 et de stabiliser l'interaction. Le système HSP90/R2TP va retenir les protéines du snRNP U5 non mature dans le cytoplasme mais aussi probablement dans le noyau jusqu'à ce que la particule U5 soit correctement assemblée. La maturation de la tri-snRNP U4/U6-U5 se termine dans les corps de Cajal (CB) (*Staněk and Neugebauer, 2004 ; Staněk, 2003*). Ce compartiment nucléaire va assurer un contrôle de qualité en retenant les complexes mal formés à plusieurs étapes de la biogenèse des snRNP. Cela passe par la vérification de l'association du complexe d'export nucléaire (*Suzuki, 2010*) jusqu'à l'assemblage des protéines spécifiques des différents snRNP (*Novotny, 2015*) pour aboutir à la formation de la tri-snRNP mature (*Bizarro, 2015 ; Schaffert, 2004*). Tout récemment, une étude en collaboration avec D. Stanek montre le rôle du facteur TSSC4 dans les étapes tardives de l'assemblage de la tri-snRNP et le recyclage du spliceosome (*Klimesova, en revision à Nature Communication*). TSSC4 est un co-facteur du R2TP se liant aux RUVBL1 et 2. Cela laisse envisager que le R2TP soit aussi impliqué dans la formation du spliceosome et son recyclage après épissage.

L'utilisation de co-facteurs par le R2TP pour stabiliser les interactions avec ses clients a été donc mis en évidence par nous et d'autres labos. Dans le cas de l'assemblage du complexe TSC, nous n'avons pas trouvé de co-facteurs susceptibles de jouer tel un rôle. Nous pourrions à l'avenir faire appel à des nouvelles techniques de biotinylation de proximité comme leTurbo-ID afin d'identifier de nouveaux facteurs associés aux R2TP et à ces substrats. Ces facteurs pourraient interagir de manière transitoire avec les complexes ce qui rend leur détection plus difficile et

nécessite ces autres méthodes.

E. D'autres complexes R2TP-like pourraient avoir des mécanismes de reconnaissance des substrats similaires au R2TP

Il est intéressant de voir que plusieurs protéines humaines possèdent le domaine PIH de PIH1D1, domaine responsable de la reconnaissance des substrats. PIH1D2, PIH1D3 et DNAAF2 (aussi appelé Kitoun) possèdent non seulement le domaine PIH mais également le domaine CS permettant l'association à son partenaire RPAP3 au sein du R2TP. DYX1C1 possède quant à elle un domaine CTER comme RPAP3 et un domaine CS comme PIH1D1. Toutes ces protéines similaires à PIH1D1 ont des partenaires comparables à RPAP3. Plusieurs protéines du génome humain possèdent des domaines structurellement identiques aux CTER et TPR de RPAP3. SPAG1 (« *Sperm AntiGene 1* ») possède trois domaines TPR et un domaine CTER et CCDC103 (« *Coiled-Coil Domain Containing protein 103* ») possède un domaine CTER. L'existence de toutes ces protéines laissent supposer que d'autres complexes similaires au R2TP sont présents dans la cellule. DNAAF2 et DYX1C1 forment un complexe et, avec l'aide de HSP70, permettent l'incorporation de la dynéine dans les cils (Tarkar, 2013). Les dynéines sont de gros complexes protéiques spécifiques de types cellulaires précis déterminant les propriétés physiques des cils. Les études d'interactions de toutes ces protéines à permis d'identifier de nouveaux complexes similaires au R2TP tels que le R2SP composé de RUVBL1 et 2, SPAG1 et PIH1D2 (Maurizy, 2018). Ce complexe fonctionne comme le R2TP sauf que ses substrats sont enrichis dans les testicules. Les protéines SPAG1 et PIH1D2 sont également enrichies dans les testicules. En effet, la température n'est pas la même dans cet organe que dans le reste du corps (32°C contre 37°C) et on sait que le flagelle des spermatozoïdes est un cil mobile spécialisé. Il a été montré que le R2SP facilite le repliement et l'assemblage de protéines dans un environnement à 32°C (Maurizy, 2018). Des études par mutations de ces facteurs pourraient permettre de comprendre les mécanismes et notamment montrer que le domaine PIH1 peut jouer un rôle fondamental dans ce complexe. Des études structurales du R2SP par Cro-EM sont en cours (collaboration avec X. Manival à Nancy, S Cianferani à Strasbourg et C Plisson à Toulouse). Cela contribuera à comprendre le mode de fonctionnement de ce complexe et par analogie peut aider à comprendre comment le R2TP fonctionne.

F. Rôle du R2TP dans l'homéostasie des tissus

Comme dit précédemment, le R2TP va permettre l'assemblage de machineries nécessaires à la

cellule car impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la biogenèse des ARN ou encore dans la transcription. Ces machineries participent à la prolifération cellulaire ce qui a amené notre équipe à étudier le rôle du R2TP dans l'épithélium intestinal murin qui est un organe en régénération perpétuelle. HSP90 et les protéines RUVBL1 et RUVBL2 sont connus pour être sur-exprimés dans les cancers hépatiques et colorectaux (*Haurie, 2009 ; Huber, 2008*). La délétion de RPAP3 est viable chez la levure et la drosophile cependant elle est létale chez la souris car il est nécessaire au développement embryonnaire. Un seul allèle de RPAP3 est suffisant au maintien de l'homéostasie tissulaire intestinale. En revanche, une délétion inductible de RPAP3 perturbe l'organisation des villosités avec une perte de la morphologie de l'épithélium intestinal. L'assemblage de plusieurs clients du R2TP sont perturbés et notamment les ARN polymérases II en absence de RPAP3 dans les cellules intestinales en prolifération. Les protéines des snoRNP (NOP58) ou des snRNP (PRPF8, EFTUD2) sont légèrement déstabilisées par l'absence de RPAP3 dans les tissus intestinaux. Les PIKK sont les substrats du R2TP les plus sensibles à l'absence de RPAP3 induite dans l'intestin. Dans ce cas là, le R2TP va être recruté par le complexe TTT pour assembler les PIKK avec leurs partenaires (*Hořejší, 2010*). Il serait intéressant de savoir si le complexe TTT est modulé par l'absence de R2TP fonctionnel. Cette absence de R2TP fonctionnel génère aussi un défaut dans le stock des ARN polymérases puisqu'une accumulation cytoplasmique de RPB1 a été observée dans les cellules qui prolifèrent le plus. RPB1 a besoin du R2TP pour être assemblé avec l'ARN Pol II et ceci avant leur importation dans le noyau (*Boulon, 2010*). Le modèle murin KO inductible pour RPAP3 met en évidence pour la première fois le rôle du R2TP dans des tissus de mammifères en prolifération (*Maurizy, en révision chez Nat Commun*).

Au sein de l'épithélium intestinal, RPAP3 est retrouvé exprimé dans les cellules du compartiment d'amplification et dans les cellules souches. Dans l'intestin grêle comme dans le colon, la délétion de RPAP3 entraîne une perte du renouvellement des cellules constituant l'épithélium. Le renouvellement des cellules est cependant plus rapide dans l'intestin que dans le colon ce qui explique le délai d'apparition du phénotype à J7 pour l'intestin contre J10 pour le colon. Le modèle de souris avec un seul allèle de RPAP3 étant viable, il pourra être utilisé pour étudier le rôle du R2TP dans des cancers du colon induits.

G. mTOR, TSC et HSP90 dans les cancers

HSP90 est retrouvé sur-exprimé dans des conditions pathologiques comme les infections virales, les processus d'inflammation et dans plusieurs types de cancers (*Whitesell and Lindquist, 2005 ; Luo W, 2010 ; Geller R, 2012*). Plusieurs protéines oncogéniques dépendent également de HSP90 et de ses co-facteurs pour leur repliement et leur maturation comme AKT, NF- κ B ou p53 qui vont ensuite inhiber l'apoptose et donc favoriser la carcinogénèse. HSP90 a donc lui aussi été

ciblé par les traitements anticancéreux afin de déstabiliser ses clients oncogéniques. Cependant, les premiers inhibiteurs de HSP90 ont entraîné de gros effets secondaires, notamment une importante hépato-toxicité.

Le développement tumoral résulte d'une dérégulation d'une ou plusieurs voies de signalisation. La voie mTOR est souvent dérégulée à cause d'une mutation génétique entraînant son hyperactivation. La dérégulation des voies en amont ou en aval vont favoriser la carcinogenèse avec l'acquisition de nouvelles fonctions cellulaires telles que la transformation, la croissance et la survie cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la formation de métastases. Toutes ses fonctions vont souvent s'accompagner d'une résistance aux médicaments rendant les inhibiteurs de mTOR en mono-thérapie inefficaces.

Les hamartomes sont des sous-types de tumeurs bénignes possédant une histologie particulière. Au sein d'un hamartome, les cellules tumorales vont avoir une différenciation normale mais désorganisée et ne respectant pas l'architecture tissulaire à laquelle elle appartient. Le cas d'hamartome le plus caractérisé est la Sclérose Tubéreuse. Il s'agit d'une maladie génétique se caractérisant par la formation de nombreux hamartomes dans différents organes incluant la peau, le foie ou encore le cerveau. La Sclérose Tubéreuse est due à des mutations dans les gènes codant TSC1 et/ou TSC2 entraînant une perte ou une réduction de la fonction du complexe TSC. La voie mTORC1 n'est donc plus régulée et va activer de manière anarchique la croissance et la prolifération cellulaire (*El-Hashemite, 2003 ; Kwiatkowski, 2003*). Différentes études faites chez la souris ainsi que plusieurs essais cliniques utilisent la rapamycine comme traitement de la Sclérose Tubéreuse qui montrent des effets prometteur dans la régulation de la pathologie (*Sawyers CL, 2003 ; Kenerson, 2002*). Une meilleure connaissance du rôle du R2TP sur la formation du complexe TSC et la régulation de la voie mTORC1 pourra contribuer à définir de nouveaux inhibiteurs ciblant le R2TP et pouvant avoir une action sur la Sclérose Tubéreuse.

Aujourd'hui, le choix et la combinaison des drogues joue un rôle critique dans l'amélioration des thérapeutiques cliniques anti-cancéreuses. L'objectif commun de toutes ces études est de trouver la drogue ou le traitement le plus efficace et le moins toxique possible.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abel Y, Paiva ACF, Bizarro J, Chagot M-E, Santo PE, Robert M-C, et al. NOPCHAP1 is a PAQosome cofactor that helps loading NOP58 on RUVBL1/2 during box C/D snoRNP biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(2):1094-113.
2. Acker J, de Graaff M, Cheynel I, Khazak V, Kedinger C, Vigneron M. Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J Biol Chem.* 4 juill 1997;272(27):16815-21.
3. Afanasyeva A, Hirtreiter A, Schreiber A, Grohmann D, Pobegalov G, McKay AR, et al. Lytic Water Dynamics Reveal Evolutionarily Conserved Mechanisms of ATP Hydrolysis by TIP49 AAA+ ATPases. *Structure.* avr 2014;22(4):549-59.
4. Ahn J-Y, Lee J-S, Min H-Y, Lee H-Y. Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer. *Oncotarget.* 20 oct 2015;6(32):32622-33.
5. Alatwi HE, Downs JA. Removal of H2A.Z by INO80 promotes homologous recombination. *EMBO Rep.* août 2015;16(8):986-94.
6. Ali MMU, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, et al. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature.* 20 avr 2006;440(7087):1013-7.
7. Ali MMU, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, et al. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature.* 20 avr 2006;440(7087):1013-7.
8. Ambegaokar SS, Jackson GR. Functional genomic screen and network analysis reveal novel modifiers of tauopathy dissociated from tau phosphorylation. *Hum Mol Genet.* 15 déc 2011;20(24):4947-77.
9. Ammirante M, Rosati A, Gentilella A, Festa M, Petrella A, Marzullo L, et al. The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NF-kappa B transcription factors. *Oncogene.* 14 févr 2008;27(8):1175-8.
10. Anckar J, Sistonen L. Heat Shock Factor 1 as a Coordinator of Stress and Developmental Pathways. In: Csermely P, Vigh L, éditeurs. *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* [Internet]. New York, NY: Springer; 2007 [cité 10 mars 2021]. p. 78-88. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_8
11. Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80(1):1089-115.
12. Anderson CM, Blackburn EH. Mec1 function in the DNA damage response does not require its interaction with Tel2. *Cell Cycle.* déc 2008;7(23):3695-8.
13. Andersson A, Ritz C, Lindgren D, Edén P, Lassen C, Heldrup J, et al. Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia.* juin 2007;21(6):1198-203.
14. Aoki S, Kong D, Matsui K, Rachmat R, Kobayashi M. Sesquiterpene aminoquinones, from a marine sponge, induce erythroid differentiation in human chronic myelogenous leukemia, K562 cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* août 2004;52(8):935-7.
15. Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol.* avr 2000;20(7):2475-87.
16. Arai M, Kawachi T, Sato H, Setiawan A, Kobayashi M. Marine spongian sesquiterpene phenols, dictyoceratin-C and smenospondiol, display hypoxia-selective growth inhibition against cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 15 juill 2014;24(14):3155-7.
17. Armijo ME, Campos T, Fuentes-Villalobos F, Palma ME, Pincheira R, Castro AF. Rheb signaling and

tumorigenesis: mTORC1 and new horizons. *International Journal of Cancer*. 2016;138(8):1815-23.

18. Arranz R, Martín-Benito J, Valpuesta JM. Structure and Function of the Cochaperone Prefoldin. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1106:119-31.
19. Assimon VA, Tang Y, Vargas JD, Lee GJ, Wu ZY, Lou K, et al. CB-6644 Is a Selective Inhibitor of the RUVBL1/2 Complex with Anticancer Activity. *ACS Chem Biol*. 15 févr 2019;14(2):236-44.
20. Astrinidis A, Senapedis W, Coleman TR, Henske EP. Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem*. 19 déc 2003;278(51):51372-9.
21. Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 15 mars 2016;129(6):1285.
22. Back R, Dominguez C, Rothé B, Bobo C, Beaufile C, Moréra S, et al. High-Resolution Structural Analysis Shows How Tah1 Tethers Hsp90 to the R2TP Complex. *Structure*. 8 oct 2013;21(10):1834-47.
23. Ballif BA, Roux PP, Gerber SA, MacKeigan JP, Blenis J, Gygi SP. Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 janv 2005;102(3):667-72.
24. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*. 31 mai 2013;340(6136):1100-6.
25. Bar-Peled L, Sabatini DM. SnapShot: mTORC1 signaling at the lysosomal surface. *Cell*. 7 déc 2012;151(6):1390-1390.e1.
26. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology*. 1 juill 2014;24(7):400-6.
27. Bardwell JC, Craig EA. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *PNAS*. 1 août 1987;84(15):5177-81.
28. Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 14 avr 2005;434(7035):864-70.
29. Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, et al. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J*. 15 nov 2000;19(22):6121-30.
30. Benbahouche NEH, Iliopoulos I, Török I, Marhold J, Henri J, Kajava AV, et al. *Drosophila* Spag Is the Homolog of RNA Polymerase II-associated Protein 3 (RPAP3) and Recruits the Heat Shock Proteins 70 and 90 (Hsp70 and Hsp90) during the Assembly of Cellular Machineries. *J Biol Chem*. 28 févr 2014;289(9):6236-47.
31. Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC, Cheadle JP, et al. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*. 14 déc 2000;19(54):6306-16.
32. Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, Fan J, Thomas AA, Santos TG, et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *The FASEB Journal*. 2013;27(9):3594-607.
33. Berasain C. New therapeutic targets in HCC: reptin ATPase and HCC senescence. *J Hepatol*. mai 2010;52(5):633-4.
34. Bhattacharya K, Bernasconi L, Picard D. Luminescence resonance energy transfer between genetically encoded donor and acceptor for protein-protein interaction studies in the molecular chaperone HSP70/HSP90 complexes. *Scientific Reports*. 12 févr 2018;8(1):2801.

35. Bhattacharya K, Weidenauer L, Luengo TM, Pieters EC, Echeverría PC, Bernasconi L, et al. The Hsp70-Hsp90 co-chaperone Hop/Stip1 shifts the proteostatic balance from folding towards degradation. *Nat Commun [Internet]*. 25 nov 2020 [cité 10 mars 2021];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7688965/>
36. Bizarro J, Charron C, Boulon S, Westman B, Pradet-Balade B, Vandermoere F, et al. Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *Journal of Cell Biology*. 17 nov 2014;207(4):463-80.
37. Bizarro J, Dodré M, Huttin A, Charpentier B, Schlotter F, Branlant C, et al. NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Research*. 15 oct 2015;43(18):8973-89.
38. Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R. DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 mars 2004;101(12):4100-5.
39. Bonnefoy-Bérard N, Liu YC, von Willebrand M, Sung A, Elly C, Mustelin T, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 oct 1995;92(22):10142-6.
40. Boon K-L, Grainger RJ, Ehsani P, Barrass JD, Auchynnika T, Inglehearn CF, et al. prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat Struct Mol Biol*. nov 2007;14(11):1077-83.
41. Boulbés DR, Shaiken T, Sarbassov DD. Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem Biophys Res Commun*. 16 sept 2011;413(1):46-52.
42. Boulon S, Bertrand E, Pradet-Balade B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: Building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biology*. févr 2012;9(2):148-54.
43. Boulon S, Marmier-Gourrier N, Pradet-Balade B, Wurth L, Verheggen C, Jády BE, et al. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol*. 11 févr 2008;180(3):579-95.
44. Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, et al. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell*. 24 sept 2010;39(6):912-24.
45. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. nov 2018;68(6):394-424.
46. Broemer M, Krappmann D, Scheiderei C. Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation. *Oncogene*. juill 2004;23(31):5378-86.
47. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 1 déc 2004;18(23):2893-904.
48. Budzyński MA, Puustinen MC, Joutsen J, Sistonen L. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Mol Cell Biol*. juill 2015;35(14):2530-40.
49. Buerger C, DeVries B, Stambolic V. Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 juin 2006;344(3):869-80.
50. Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5 févr 2002;99(3):1218-22.

51. Cai S-L, Tee AR, Short JD, Bergeron JM, Kim J, Shen J, et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol.* 24 avr 2006;173(2):279-89.
52. Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Kusch T, Li B, et al. The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem.* 8 avr 2005;280(14):13665-70.
53. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* mars 2006;31(3):164-72.
54. Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol.* févr 2007;17(2):87-92.
55. Capo-Chichi J-M, Tcherkezian J, Hamdan FF, Décarie JC, Dobrzeniecka S, Patry L, et al. Disruption of TBC1D7, a subunit of the TSC1-TSC2 protein complex, in intellectual disability and megalencephaly. *J Med Genet.* nov 2013;50(11):740-4.
56. Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, et al. A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Mol Syst Biol.* 21 déc 2010;6:453.
57. Carrière A, Cargnello M, Julien L-A, Gao H, Bonneil E, Thibault P, et al. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol.* 9 sept 2008;18(17):1269-77.
58. Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, et al. Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *Elife.* 7 janv 2016;5.
59. Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem.* 29 août 2003;278(35):32493-6.
60. Chano T, Saji M, Inoue H, Minami K, Kobayashi T, Hino O, et al. Neuromuscular abundance of RB1CC1 contributes to the non-proliferating enlarged cell phenotype through both RB1 maintenance and TSC1 degradation. *International Journal of Molecular Medicine.* 1 sept 2006;18(3):425-32.
61. Chaudhury S, Welch TR, Blagg BSJ. Hsp90 as a Target for Drug Development. *ChemMedChem.* 2006;(1):1331-40.
62. Chen D, Tao X, Zhou L, Sun F, Sun M, Fang X. Spaghetti, a homolog of human RPAP3 (RNA polymerase II-associated protein 3), determines the fate of germline stem cells in *Drosophila* ovary. *Cell Biology International.* 2018;42(7):769-80.
63. Chen L, Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, et al. Subunit organization of the human INO80 chromatin remodeling complex: an evolutionarily conserved core complex catalyzes ATP-dependent nucleosome remodeling. *J Biol Chem.* 1 avr 2011;286(13):11283-9.
64. Chen W-Y, Chang F-R, Huang Z-Y, Chen J-H, Wu Y-C, Wu C-C. Tubocapsenolide A, a Novel Withanolide, Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-231 Cells by Thiol Oxidation of Heat Shock Proteins*. *Journal of Biological Chemistry.* 20 juin 2008;283(25):17184-93.
65. Chen Y, Chen H, Rhoad AE, Warner L, Caggiano TJ, Failli A, et al. A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 août 1994;203(1):1-7.
66. Cheong JH, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J.* 3 janv 1995;14(1):143-50.
67. Cheung KLY, Huen J, Kakihara Y, Houry WA, Ortega J. Alternative Oligomeric States of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex Induced by Histidine Tags. *Journal of Molecular Biology.* 3 déc 2010;404(3):478-92.
68. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is

mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 8 juill 2005;280(27):25485-90.

69. Chiu MI, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 déc 1994;91(26):12574-8.

70. Cho SG, Bhoumik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, Ronai Z. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol.* déc 2001;21(24):8398-413.

71. Cho T-M, Kim JY, Kim Y-J, Sung D, Oh E, Jang S, et al. C-terminal HSP90 inhibitor L80 elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition. *Cancer Lett.* 10 avr 2019;447:141-53.

72. Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, et al. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 31 mars 2006;281(13):8313-6.

73. Clark GJ, Kinch MS, Rogers-Graham K, Sebt SM, Hamilton AD, Der CJ. The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J Biol Chem.* 18 avr 1997;272(16):10608-15.

74. Claudius A-K, Romani P, Lamkemeyer T, Jindra M, Uhlirova M. Unexpected role of the steroid-deficiency protein ecdysoneless in pre-mRNA splicing. *PLoS Genet.* avr 2014;10(4):e1004287.

75. Cloutier P, Al-Khoury R, Lavallée-Adam M, Faubert D, Jiang H, Poitras C, et al. High-resolution mapping of the protein interaction network for the human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-associated complexes. *Methods.* août 2009;48(4):381-6.

76. Cloutier P, Coulombe B. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem Cell Biol.* avr 2010;88(2):211-21.

77. Cloutier P, Poitras C, Durand M, Hekmat O, Fiola-Masson É, Bouchard A, et al. R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein. *Nat Commun.* août 2017;8(1):15615.

78. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 6 mars 2003;422(6927):37-44.

79. Coulombe B, Cloutier P, Gauthier M-S. How do our cells build their protein interactome? *Nature Communications.* 27 juill 2018;9(1):1-3.

80. Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, et al. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science.* 28 avr 2000;288(5466):640-9.

81. Crino PB. Molecular pathogenesis of tuber formation in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol.* sept 2004;19(9):716-25.

82. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med.* 28 sept 2006;355(13):1345-56.

83. Csermely P, Schnaider T, So C, Nardai G, Prohászka Z. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacology & Therapeutics.* août 1998;79(2):40.

84. Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J.* 3 juin 2002;21(11):2746-56.

85. Darzacq X, Kittur N, Roy S, Shav-Tal Y, Singer RH, Meier UT. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *Journal of Cell Biology.* 17 avr 2006;173(2):207-18.

86. Dasgupta B, Yi Y, Hegedus B, Weber JD, Gutmann DH. Cerebrospinal fluid proteomic analysis reveals dysregulation of methionine aminopeptidase-2 expression in human and mouse neurofibromatosis 1-associated glioma. *Cancer Res.* 1 nov 2005;65(21):9843-50.

87. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol.* sept 2005;7(9):847-9.
88. Decatur WA, Fournier MJ. RNA-guided Nucleotide Modification of Ribosomal and Other RNAs *. *Journal of Biological Chemistry.* 10 janv 2003;278(2):695-8.
89. Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, Lipson D, Frimer H, Rienstein S, et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* mai 2007;56(2):175-84.
90. Demetriades C, Plescher M, Teleman AA. Lysosomal recruitment of TSC2 is a universal response to cellular stress. *Nat Commun.* 12 févr 2016;7:10662.
91. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science.* 2 nov 2001;294(5544):1102-5.
92. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes Dev.* 15 janv 2008;22(2):239-51.
93. Di Fiore PP, von Zastrow M. Endocytosis, signaling, and beyond. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 août 2014;6(8).
94. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, et al. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell.* 24 août 2012;47(4):535-46.
95. Donnelly A, Blagg BSJ. Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2702-17.
96. Dorjsuren D, Lin Y, Wei W, Yamashita T, Nomura T, Hayashi N, et al. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol.* déc 1998;18(12):7546-55.
97. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* janv 2003;3(1):11-22.
98. Ducat D, Kawaguchi S-I, Liu H, Yates JR, Zheng Y. Regulation of microtubule assembly and organization in mitosis by the AAA+ ATPase Pontin. *Mol Biol Cell.* juill 2008;19(7):3097-110.
99. Dugan KA, Wood MA, Cole MD. TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene.* 29 août 2002;21(38):5835-43.
100. Dunn DM, Woodford MR, Truman AW, Jensen SM, Schulman J, Caza T, et al. c-Abl Mediated Tyrosine Phosphorylation of Aha1 Activates Its Co-chaperone Function in Cancer Cells. *Cell Rep.* 11 août 2015;12(6):1006-18.
101. Dyrskjøt L, Kruhøffer M, Thykjaer T, Marcussen N, Jensen JL, Møller K, et al. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res.* 1 juin 2004;64(11):4040-8.
102. Echeverría PC, Bernthaler A, Dupuis P, Mayer B, Picard D. An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS One.* 2011;6(10):e26044.
103. Eckert K, Saliou J-M, Monlezun L, Vigouroux A, Atmane N, Caillat C, et al. The Pih1-Tah1 Cochaperone Complex Inhibits Hsp90 Molecular Chaperone ATPase Activity. *J Biol Chem.* 10 août 2010;285(41):31304-12.
104. Edinger AL, Thompson CB. An activated mTOR mutant supports growth factor-independent, nutrient-dependent cell survival. *Oncogene.* 22 juill 2004;23(33):5654-63.
105. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 28 janv 2011;331(6016):456-61.

106. Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, et al. DNA Binding Specificity of Different STAT Proteins: COMPARISON OF IN VITRO SPECIFICITY WITH NATURAL TARGET SITES * 210. *Journal of Biological Chemistry*. 2 mars 2001;276(9):6675-88.
107. El-Hashemite N, Walker V, Zhang H, Kwiatkowski DJ. Loss of Tsc1 or Tsc2 induces vascular endothelial growth factor production through mammalian target of rapamycin. *Cancer Res*. 1 sept 2003;63(17):5173-7.
108. Elkaim J, Castroviejo M, Bennani D, Taouji S, Allain N, Laguerre M, et al. First identification of small-molecule inhibitors of Pontin by combining virtual screening and enzymatic assay. *Biochemical Journal*. 27 mars 2012;443(2):549-59.
109. Elkaim J, Lamblin M, Laguerre M, Rosenbaum J, Lestienne P, Eloy L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of Pontin ATPase inhibitors through a molecular docking approach. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 juin 2014;24(11):2512-6.
110. Eskew JD, Sadikot T, Morales P, Duren A, Dunwiddie I, Swink M, et al. Development and characterization of a novel C-terminal inhibitor of Hsp90 in androgen dependent and independent prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 31 oct 2011;11:468.
111. Fan Q, Aksoy O, Wong RA, Ilkhanizadeh S, Novotny CJ, Gustafson WC, et al. A Kinase Inhibitor Targeted to mTORC1 Drives Regression in Glioblastoma. *Cancer Cell*. 13 mars 2017;31(3):424-35.
112. Fawal M-A, Brandt M, Djouder N. MCRS1 binds and couples Rheb to amino acid-dependent mTORC1 activation. *Dev Cell*. 6 avr 2015;33(1):67-81.
113. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggiero D, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 10 févr 2009;7(2):e38.
114. Feng Y, Lee N, Fearon ER. TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res*. 15 déc 2003;63(24):8726-34.
115. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer*. 1992;51(4):613-9.
116. Fielding AB, Dobreva I, McDonald PC, Foster LJ, Dedhar S. Integrin-linked kinase localizes to the centrosome and regulates mitotic spindle organization. *J Cell Biol*. 25 févr 2008;180(4):681-9.
117. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*. 19 sept 1997;90(6):1023-9.
118. Flavin P, Redmond A, McBryan J, Cocchiglia S, Tibbitts P, Fahy-Browne P, et al. RuvB12 cooperates with Ets2 to transcriptionally regulate hTERT in colon cancer. *FEBS Lett*. 4 août 2011;585(15):2537-44.
119. Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, et al. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem*. 1 janv 2010;285(1):80-94.
120. Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan H-M, et al. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports*. 1 juin 2003;4(6):575-80.
121. Frasa MAM, Koessmeier KT, Ahmadian MR, Braga VMM. Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18 janv 2012;13(2):67-73.
122. Frey S, Leskovar A, Reinstein J, Buchner J. The ATPase Cycle of the Endoplasmic Chaperone Grp94 *. *Journal of Biological Chemistry*. 7 déc 2007;282(49):35612-20.
123. Frydman J, Höhfeld J. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci*. mars 1997;22(3):87-92.
124. Galej WP, Oubridge C, Newman AJ, Nagai K. Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the

spliceosome. *Nature*. 31 janv 2013;493(7434):638-43.

125. Gallant P. Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol*. avr 2007;17(4):187-92.
126. Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa T, Srinivasula S, et al. PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- δ phosphorylation and cell migration downstream of Ga12. *Nat Cell Biol*. 20 mai 2012;14(7):686-96.
127. Gangaraju VK, Yin H, Weiner MM, Wang J, Huang XA, Lin H. *Drosophila* Piwi functions in Hsp90-mediated suppression of phenotypic variation. *Nat Genet*. févr 2011;43(2):153-8.
128. Gangloff Y-G, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz J-F, et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol*. nov 2004;24(21):9508-16.
129. Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*. 1 mai 2009;284(18):12297-305.
130. Gao X, Pan D. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev*. 1 juin 2001;15(11):1383-92.
131. Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell*. juin 2003;11(6):1457-66.
132. García-Martínez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, et al. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*. 12 juin 2009;421(1):29-42.
133. Gartner W, Rossbacher J, Zierhut B, Daneva T, Base W, Weissel M, et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell Motil Cytoskeleton*. oct 2003;56(2):79-93.
134. Gauthier M-S, Cloutier P, Coulombe B. Role of the PAQosome in Regulating Arrangement of Protein Quaternary Structure in Health and Disease. In: Djouder N, éditeur. *Prefoldins: the new chaperones* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 8 avr 2020]. p. 25-36. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 1106). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-00737-9_3
135. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. déc 2007;8(12):947-56.
136. Genest O, Hoskins JR, Kravats AN, Doyle SM, Wickner S. Hsp70 and Hsp90 of *E. coli* Directly Interact for Collaboration in Protein Remodeling. *Journal of Molecular Biology*. 4 déc 2015;427(24):3877-89.
137. Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 1 févr 2019;294(6):2109-20.
138. Gentili C, Castor D, Kaden S, Lauterbach D, Gysi M, Steigemann P, et al. Chromosome Missegregation Associated with RUVBL1 Deficiency. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133576.
139. Ghane ShahrbaF F, Assadi F. Drug-induced renal disorders. *J Renal Inj Prev*. 2015;4(3):57-60.
140. Ghobrial IM, Siegel DS, Vij R, Berdeja JG, Richardson PG, Neuwirth R, et al. TAK-228 (formerly MLN0128), an investigational oral dual TORC1/2 inhibitor: A phase I dose escalation study in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, or Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol*. juin 2016;91(4):400-5.
141. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 1 avr 2001;15(7):807-26.
142. Giot L. A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 5 déc 2003;302(5651):1727-36.

143. Giulino-Roth L, van Besien HJ, Dalton T, Totonchy JE, Rodina A, Taldone T, et al. Inhibition of Hsp90 Suppresses PI3K/AKT/mTOR Signaling and Has Antitumor Activity in Burkitt Lymphoma. *Mol Cancer Ther.* sept 2017;16(9):1779-90.
144. Goetz MP, Toft D, Reid J, Ames M, Stensgard B, Safgren S, et al. Phase I Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Patients With Advanced Cancer. *JCO.* 20 févr 2005;23(6):1078-87.
145. Gómez AV, Galleguillos D, Maass JC, Battaglioli E, Kukuljan M, Andrés ME. CoREST Represses the Heat Shock Response Mediated by HSF1. *Molecular Cell.* 25 juill 2008;31(2):222-31.
146. Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, et al. Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *J Biol Chem.* 23 août 2002;277(34):30958-67.
147. Gonzales FA, Zanchin NIT, Luz JS, Oliveira CC. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a Novel Nop58p-Interacting Protein that is Involved in Pre-rRNA Processing. *Journal of Molecular Biology.* 18 févr 2005;346(2):437-55.
148. Gorgoulis VG, Vassiliou L-VF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 14 avr 2005;434(7035):907-13.
149. Gorynia S, Bandejas TM, Pinho FG, McVey CE, Vonrhein C, Round A, et al. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine – The RuvBL1/RuvBL2 complex. *Journal of Structural Biology.* 1 déc 2011;176(3):279-91.
150. Graf C, Stankiewicz M, Kramer G, Mayer MP. Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. *EMBO J.* 4 mars 2009;28(5):602-13.
151. Graudens E, Boulanger V, Mollard C, Mariage-Samson R, Barlet X, Grémy G, et al. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol.* 2006;7(3):R19.
152. Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, et al. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 janv 2006;103(1):57-62.
153. Grigoletto A, Lestienne P, Rosenbaum J. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1 avr 2011;1815(2):147-57.
154. Grimm C, Chari A, Pelz J-P, Kuper J, Kisker C, Diederichs K, et al. Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation. *Mol Cell.* 21 févr 2013;49(4):692-703.
155. Gromov PS, Madsen P, Tomerup N, Celis JE. A novel approach for expression cloning of small GTPases: identification, tissue distribution and chromosome mapping of the human homolog of rheb. *FEBS Lett.* 18 déc 1995;377(2):221-6.
156. Grozdanov PN, Roy S, Kittur N, Meier UT. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA.* juin 2009;15(6):1188-97.
157. Gstaiger M, Luke B, Hess D, Oakeley EJ, Wirbelauer C, Blondel M, et al. Control of Nutrient-Sensitive Transcription Programs by the Unconventional Prefoldin URI. *Science.* 14 nov 2003;302(5648):1208-12.
158. Gu J, Li X, Liang Y, Qiao L, Ran D, Lu Y, et al. Upregulation of URI/RMP gene expression in cervical cancer by high-throughput tissue microarray analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(4):669-77.
159. Gu J, Liang Y, Qiao L, Li X, Li X, Lu Y, et al. Expression analysis of URI/RMP gene in endometrioid adenocarcinoma by tissue microarray immunohistochemistry. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(11):2396-403.
160. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the

mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell*. déc 2006;11(6):859-71.

161. Guo A, Lu P, Lee J, Zhen C, Chiosis G, Wang YL. HSP90 stabilizes B-cell receptor kinases in a multi-client interactome: PU-H71 induces CLL apoptosis in a cytoprotective microenvironment. *Oncogene*. juin 2017;36(24):3441-9.

162. Guo H, Zhang X-Y, Peng J, Huang Y, Yang Y, Liu Y, et al. RUVBL1, a novel C-RAF-binding protein, activates the RAF/MEK/ERK pathway to promote lung cancer tumorigenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. avr 2018;498(4):932-9.

163. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 25 avr 2008;30(2):214-26.

164. Hallais M, Pontvianne F, Andersen PR, Clerici M, Lener D, Benbahouche NEH, et al. CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nature Structural & Molecular Biology*. déc 2013;20(12):1358-66.

165. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*. janv 2016;8(1):57-84.

166. Hanker AB, Mitin N, Wilder RS, Henske EP, Tamanoi F, Cox AD, et al. Differential requirement of CAXX-mediated posttranslational processing for Rheb localization and signaling. *Oncogene*. 21 janv 2010;29(3):380-91.

167. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 26 juill 2002;110(2):177-89.

168. Hardie DG. New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol*. avr 2005;17(2):167-73.

169. Harris SF, Shiau AK, Agard DA. The Crystal Structure of the Carboxy-Terminal Dimerization Domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, Reveals a Potential Substrate Binding Site. *Structure*. 1 juin 2004;12(6):1087-97.

170. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P, Kraut N, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 1 oct 2004;22(19):3937-49.

171. Haurie V, Ménard L, Nicou A, Touriol C, Metzler P, Fernandez J, et al. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology*. 2009;50(6):1871-83.

172. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 15 août 2004;18(16):1926-45.

173. Hayashi T, Hatanaka M, Nagao K, Nakaseko Y, Kanoh J, Kokubu A, et al. Rapamycin sensitivity of the Schizosaccharomyces pombe tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to Cells*. 2007;12(12):1357-70.

174. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. 2014;2014:128436.

175. Heimberger T, Andrulis M, Riedel S, Stühmer T, Schraud H, Beilhack A, et al. The heat shock transcription factor 1 as a potential new therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol*. févr 2013;160(4):465-76.

176. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 23 août 1991;253(5022):905-9.

177. Henri J, Chagot M-E, Bourguet M, Abel Y, Terral G, Maurizy C, et al. Deep Structural Analysis of RPAP3 and PIH1D1, Two Components of the HSP90 Co-chaperone R2TP Complex. *Structure*. sept 2018;26(9):1196-1209.e8.

178. Hessling M, Richter K, Buchner J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular

chaperone Hsp90. *Nature Structural & Molecular Biology*. mars 2009;16(3):287-93.

179. Hodges AK. Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberin. *Human Molecular Genetics*. 1 déc 2001;10(25):2899-905.
180. Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J*. 16 juill 2001;20(14):3800-10.
181. Holmberg CI, Tran SEF, Eriksson JE, Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences*. 1 déc 2002;27(12):619-27.
182. Hoogeveen-Westerveld M, Exalto C, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, Nellist M. Analysis of TSC1 truncations defines regions involved in TSC1 stability, aggregation and interaction. *Biochim Biophys Acta*. sept 2010;1802(9):774-81.
183. Hořejší Z, Stach L, Flower TG, Joshi D, Flynn H, Skehel JM, et al. Phosphorylation-Dependent PIH1D1 Interactions Define Substrate Specificity of the R2TP Cochaperone Complex. *Cell Reports*. 10 avr 2014;7(1):19-26.
184. Hořejší Z, Takai H, Adelman CA, Collis SJ, Flynn H, Maslen S, et al. CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. *Mol Cell*. 24 sept 2010;39(6):839-50.
185. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. avr 2009;20(7):1981-91.
186. Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. sept 2018;19(9):2560.
187. Houry WA, Bertrand E, Coulombe B. The PAQosome, an R2TP-Based Chaperone for Quaternary Structure Formation. *Trends in Biochemical Sciences*. janv 2018;43(1):4-9.
188. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*. 22 févr 2012;485(7396):55-61.
189. Hsu Y-C, Chern JJ, Cai Y, Liu M, Choi K-W. *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature*. 15 févr 2007;445(7129):785-8.
190. HUANG J, MANNING BD. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 1 juin 2008;412(2):179-90.
191. Huang Y, Chen L, Zhou Y, Liu H, Yang J, Liu Z, et al. UXT-V1 protects cells against TNF-induced apoptosis through modulating complex II formation. *MBoC*. 9 févr 2011;22(8):1389-97.
192. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 27 janv 1995;80(2):225-36.
193. Hurov KE, Cotta-Ramusino C, Elledge SJ. A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability. *Genes Dev*. 1 sept 2010;24(17):1939-50.
194. Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*. 18 août 2000;102(4):463-73.
195. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*. 8 janv 2003;17(15):1829-34.
196. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. sept 2002;4(9):648-57.
197. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, et al. TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via

a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*. 8 sept 2006;126(5):955-68.

198. Inoue M, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y. PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 déc 2010;403(3-4):340-4.

199. Ito A, Lai C-H, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, et al. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *The EMBO Journal*. 2001;20(6):1331-40.

200. Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, et al. Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Letters*. 2008;582(16):2365-70.

201. Izumi N, Yamashita A, Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, et al. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Signal*. 6 avr 2010;3(116):ra27.

202. Izumi N, Yamashita A, Ohno S. Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. *Nucleus*. 1 févr 2012;3(1):29-43.

203. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*. 6 oct 2006;127(1):125-37.

204. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. nov 2004;6(11):1122-8.

205. Jády BE, Bertrand E, Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *Journal of Cell Biology*. 23 févr 2004;164(5):647-52.

206. Jády BE, Darzacq X, Tucker KE, Matera AG, Bertrand E, Kiss T. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J*. 15 avr 2003;22(8):1878-88.

207. Jaeschke A, Hartkamp J, Saitoh M, Roworth W, Nobukuni T, Hodges A, et al. Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositol-3-OH kinase is mTOR independent. *J Cell Biol*. 28 oct 2002;159(2):217-24.

208. Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumorigenesis and targeted antitumour therapy. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(3):479-98.

209. Jarosz DF, Lindquist S. Hsp90 and Environmental Stress Transform the Adaptive Value of Natural Genetic Variation. *Science*. 24 déc 2010;330(6012):1820-4.

210. Jeganathan A, Leong V, Zhao L, Huen J, Nano N, Houry WA, et al. Yeast rvb1 and rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. *J Mol Biol*. 22 mai 2015;427(10):1875-86.

211. Jeong YY, Her J, Oh S-Y, Chung IK. Hsp90-binding immunophilin FKBP52 modulates telomerase activity by promoting the cytoplasmic retrotransport of hTERT. *Biochem J*. 15 oct 2016;473(20):3517-32.

212. Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, et al. Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Molecular Cell*. 20 juill 2007;27(2):262-74.

213. Jha S, Dutta A. RVB1/RVB2: Running Rings around Molecular Biology. *Molecular Cell*. juin 2009;34(5):521-33.

214. Jiang L, Luo X, Shi J, Sun H, Sun Q, Sheikh MS, et al. PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress. *Cancer Biol Ther*. 15 mars 2011;11(6):567-73.

215. Jin F, Wienecke R, Xiao GH, Maize JC, DeClue JE, Yeung RS. Suppression of tumorigenicity by the wild-type tuberous sclerosis 2 (Tsc2) gene and its C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 août 1996;93(17):9154-9.

216. Jin G, Lee S-W, Zhang X, Cai Z, Gao Y, Chou P-C, et al. Skp2-Mediated RagA Ubiquitination Elicits a Negative Feedback to Prevent Amino-Acid-Dependent mTORC1 Hyperactivation by Recruiting GATOR1. *Mol Cell*. 18 juin 2015;58(6):989-1000.
217. Jin J, Cai Y, Yao T, Gottschalk AJ, Florens L, Swanson SK, et al. A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem*. 16 déc 2005;280(50):41207-12.
218. Jishage M, Malik S, Wagner U, Uberheide B, Ishihama Y, Hu X, et al. Transcriptional regulation by Pol II(G) involving mediator and competitive interactions of Gdown1 and TFIIF with Pol II. *Mol Cell*. 13 janv 2012;45(1):51-63.
219. Johannessen CM, Johnson BW, Williams SMG, Chan AW, Reczek EE, Lynch RC, et al. TORC1 is essential for NF1-associated malignancies. *Curr Biol*. 8 janv 2008;18(1):56-62.
220. Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 juin 2005;102(24):8573-8.
221. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. avr 2009;20(7):1992-2003.
222. Kailash R. Architecture of the Tuberous Sclerosis Protein Complex. *Journal of Molecular Biology*. 22 janv 2021;433(2):166743.
223. Kakihara Y, Houry WA. The R2TP complex: Discovery and functions | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. 2012 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0167488911002552?token=246781861B4117E37FD9F6C405888ACDAA8A399901A680423355DB1E173F233F354D8F7F2DA7A761EE19D4B1B33489E2>
224. Kakihara Y, Kiguchi T, Ohazama A, Saeki M. R2TP/PAQosome as a promising chemotherapeutic target in cancer. *Jpn Dent Sci Rev*. déc 2020;56(1):38-42.
225. Kakihara Y, Saeki M. The R2TP chaperone complex: its involvement in snoRNP assembly and tumorigenesis. *Biomolecular Concepts*. 1 déc 2014;5(6):513-20.
226. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. 25 sept 2003;425(6956):407-10.
227. Kamano Y, Saeki M, Egusa H, Kakihara Y, Houry WA, Yatani H, et al. PIH1D1 interacts with mTOR complex 1 and enhances ribosome RNA transcription. *FEBS Letters*. 11 oct 2013;587(20):3303-8.
228. Kandt RS, Haines JL, Smith M, Northrup H, Gardner RJ, Short MP, et al. Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nat Genet*. sept 1992;2(1):37-41.
229. Karagöz GE, Duarte AMS, Akoury E, Ippel H, Biernat J, Morán Luengo T, et al. Hsp90-Tau Complex Reveals Molecular Basis for Specificity in Chaperone Action. *Cell*. 27 févr 2014;156(5):963-74.
230. Karam JA, Parikh RY, Nayak D, Rosenkranz D, Gangaraju VK. Co-chaperone Hsp70/Hsp90-organizing protein (Hop) is required for transposon silencing and Piwi-interacting RNA (piRNA) biogenesis. *J Biol Chem*. 14 avr 2017;292(15):6039-46.
231. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 18 nov 2004;432(7015):316-23.
232. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2015;16(8):461-72.
233. Kawachi T, Tanaka S, Fukuda A, Sumii Y, Setiawan A, Kotoku N, et al. Target Identification of the Marine Natural Products Dictyoceratin-A and -C as Selective Growth Inhibitors in Cancer Cells Adapted to Hypoxic Environments. *Marine Drugs*. mars 2019;17(3):163.
234. Kelley PM, Schlesinger MJ. Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar

proteins in widely divergent species. *Mol Cell Biol.* mars 1982;2(3):267-74.

235. Kenerson HL, Aicher LD, True LD, Yeung RS. Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. *Cancer Res.* 15 oct 2002;62(20):5645-50.

236. Ki DH, Jeung H-C, Park CH, Kang SH, Lee GY, Lee WS, et al. Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 1 nov 2007;121(9):2005-12.

237. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 26 juill 2002;110(2):163-75.

238. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, et al. GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Molecular Cell.* 1 avr 2003;11(4):895-904.

239. Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract.* 2009;3(1):64-71.

240. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.* août 2008;10(8):935-45.

241. Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, et al. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature.* 14 avr 2005;434(7035):921-6.

242. Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient Regulation of the mTOR Complex 1 Signaling Pathway. *Mol Cells.* 30 juin 2013;35(6):463-73.

243. Kim Y-M, Stone M, Hwang TH, Kim Y-G, Dunlevy JR, Griffin TJ, et al. SH3BP4 is a negative regulator of amino acid-Rag GTPase-mTORC1 signaling. *Mol Cell.* 29 juin 2012;46(6):833-46.

244. King TH, Decatur WA, Bertrand E, Maxwell ES, Fournier MJ. A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol Cell Biol.* nov 2001;21(22):7731-46.

245. Klingauf M, Stanek D, Neugebauer KM. Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling. *Mol Biol Cell.* déc 2006;17(12):4972-81.

246. Kosano H, Stensgard B, Charlesworth MC, McMahon N, Toft D. The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem.* 4 déc 1998;273(49):32973-9.

247. Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, et al. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem.* 21 mars 2003;278(12):10189-94.

248. Kurihara E, Shien K, Torigoe H, Takeda T, Takahashi Y, Ogoshi Y, et al. Ganetespib in Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor-resistant Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* avr 2019;39(4):1767-75.

249. Kurokawa Y, Kanemaki M, Makino Y, Tamura TA. A notable example of an evolutionary conserved gene: studies on a putative DNA helicase TIP49. *DNA Seq.* 1999;10(1):37-42.

250. Kwiatkowski DJ. Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Ann Hum Genet.* janv 2003;67(Pt 1):87-96.

251. Kwiatkowski DJ, Zhang H, Bandura JL, Heiberger KM, Glogauer M, el-Hashemite N, et al. A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2002;11(5):525-34.

252. Lachowiec J, Lemus T, Borenstein E, Queitsch C. Hsp90 promotes kinase evolution. *Mol Biol Evol.* janv 2015;32(1):91-9.

253. Lackie R, Maciejewski A, Ostapchenko V, Marques Lopes J, Choy W-Y, Duennwald M, et al. The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11.
254. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 30 mars 2012;335(6076):1638-43.
255. Lauscher JC, Elez Kurtaj S, Dullat S, Lipka S, Gröne J, Buhr HJ, et al. Increased Pontin expression is a potential predictor for outcome in sporadic colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. nov 2012;28(5):1619-24.
256. Lauscher JC, Loddenkemper C, Kosel L, Gröne J, Buhr HJ, Huber O. Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue. *Hum Pathol*. juill 2007;38(7):978-85.
257. Le TTT, Zhang S, Hayashi N, Yasukawa M, Delgermaa L, Murakami S. Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and hepatitis B virus X protein. *J Biochem*. sept 2005;138(3):215-24.
258. Lee D-F, Kuo H-P, Chen C-T, Hsu J-M, Chou C-K, Wei Y, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*. 10 août 2007;130(3):440-55.
259. Lee H, Saini N, Parris AB, Zhao M, Yang X. Ganetespib induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cells through targeting of receptor tyrosine kinase signaling. *Int J Oncol*. sept 2017;51(3):967-74.
260. Lee L, Sudentas P, Donohue B, Asrican K, Worku A, Walker V, et al. Efficacy of a rapamycin analog (CCI-779) and IFN-gamma in tuberous sclerosis mouse models. *Genes Chromosomes Cancer*. mars 2005;42(3):213-27.
261. Lee MN, Ha SH, Kim J, Koh A, Lee CS, Kim JH, et al. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol*. juill 2009;29(14):3991-4001.
262. Lee Y, Sunada S, Hirakawa H, Fujimori A, Nickoloff JA, Okayasu R. TAS-116, a Novel Hsp90 Inhibitor, Selectively Enhances Radiosensitivity of Human Cancer Cells to X-rays and Carbon Ion Radiation. *Mol Cancer Ther*. janv 2017;16(1):16-24.
263. Legagneux V, Morange M, Bensaude O. Heat shock increases turnover of 90 kDa heat shock protein phosphate groups in HeLa cells. *FEBS Letters*. 1991;291(2):359-62.
264. Li HK, Matsumoto Y, Furusawa Y, Kamada T. PU-H71, a novel Hsp90 inhibitor, as a potential cancer-specific sensitizer to carbon-ion beam therapy. *J Radiat Res*. sept 2016;57(5):572-5.
265. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. oct 2002;2(10):725-34.
266. Li W, Zeng J, Li Q, Zhao L, Liu T, Björkholm M, et al. Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Mol Cancer*. 30 mai 2010;9:132.
267. Li Y, Inoki K, Vacratsis P, Guan K-L. The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem*. 18 avr 2003;278(16):13663-71.
268. Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang C-Y, Swanson J, et al. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem*. 7 déc 2007;282(49):35803-13.
269. Lim S, Glover DJ, Clark DS. Prefoldins in Archaea. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1106:11-23.
270. Lima AJS, Hoogveen-Westerveld M, Nakashima A, Maat-Kievit A, Ouweland A van den, Halley D, et al. Identification of Regions Critical for the Integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 Complex. *PLOS ONE*. 8 avr 2014;9(4):e93940.
271. Lin L, Prescott MS, Zhu Z, Singh P, Chun SY, Kuick RD, et al. Identification and characterization of a 19q12 amplicon in esophageal adenocarcinomas reveals cyclin E as the best candidate gene for this amplicon. *Cancer Res*. 15 déc 2000;60(24):7021-7.

272. Lin S-F, Lin J-D, Hsueh C, Chou T-C, Yeh C-N, Chen M-H, et al. Efficacy of an HSP90 inhibitor, ganetespib, in preclinical thyroid cancer models. *Oncotarget*. 20 juin 2017;8(25):41294-304.
273. Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem*. 14 mars 1997;272(11):7132-9.
274. Lindquist S. Protein folding sculpting evolutionary change. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2009;74:103-8.
275. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. avr 2020;21(4):183-203.
276. Liu J, Sun W, Dong W, Wang Z, Qin Y, Zhang T, et al. HSP90 inhibitor NVP-AUY922 induces cell apoptosis by disruption of the survivin in papillary thyroid carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 27 mai 2017;487(2):313-9.
277. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-Induced Energy Stress Regulates mRNA Translation and Cell Growth. *Molecular Cell*. 17 févr 2006;21(4):521-31.
278. Liu S, Li P, Dybkov O, Nottrott S, Hartmuth K, Lührmann R, et al. Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. *Science*. 6 avr 2007;316(5821):115-20.
279. Liu S, Rauhut R, Vornlocher H-P, Lührmann R. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA*. juill 2006;12(7):1418-30.
280. Liu W, Vielhauer GA, Holzbeierlein JM, Zhao H, Ghosh S, Brown D, et al. KU675, a Concomitant Heat-Shock Protein Inhibitor of Hsp90 and Hsc70 that Manifests Isoform Selectivity for Hsp90 α in Prostate Cancer Cells. *Mol Pharmacol*. juill 2015;88(1):121-30.
281. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*. 26 avr 2005;15(8):702-13.
282. López-Perrote A, Alatwi HE, Torreira E, Ismail A, Ayora S, Downs JA, et al. Structure of Yin Yang 1 Oligomers That Cooperate with RuvBL1-RuvBL2 ATPases. *J Biol Chem*. 15 août 2014;289(33):22614-29.
283. López-Perrote A, Muñoz-Hernández H, Gil D, Llorca O. Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Res*. 1 nov 2012;40(21):11086-99.
284. Lynham J, Houry WA. The Multiple Functions of the PAQosome: An R2TP- and URI1 Prefoldin-Based Chaperone Complex. In: Djouder N, éditeur. *Prefoldins: the new chaperones* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 8 avr 2020]. p. 37-72. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1106). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-00737-9_4
285. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis. *Cell*. 22 avr 2005;121(2):179-93.
286. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2009;10(5):307-18.
287. Mach KE, Furge KA, Albright CF. Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused by nitrogen starvation. *Genetics*. juin 2000;155(2):611-22.
288. Machado-Pinilla R, Liger D, Leulliot N, Meier UT. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA*. 10 janv 2012;18(10):1833-45.
289. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2017;18(3):175-86.

290. Magalska A, Schellhaus AK, Moreno-Andrés D, Zanini F, Schooley A, Sachdev R, et al. RuvB-like ATPases function in chromatin decondensation at the end of mitosis. *Dev Cell*. 10 nov 2014;31(3):305-18.
291. Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, et al. The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet*. oct 1997;6(11):1991-6.
292. Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher H-P, Lührmann R. Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6·U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*. 1 mars 2002;21(5):1148-57.
293. Makhnevych T, Houry WA. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim Biophys Acta*. mars 2012;1823(3):674-82.
294. Makino Y, Kanemaki M, Koga A, Osano K, Matsu-Ura T, Kurokawa Y, et al. Chromosome mapping and expression of human tip49 family genes. *DNA Seq*. 2000;11(1-2):145-8.
295. Malinová A, Cvačková Z, Matějů D, Hořejší Z, Abeza C, Vandermoere F, et al. Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J Cell Biol*. 5 juin 2017;216(6):1579-96.
296. Mandal AK, Lee P, Chen JA, Nillegoda N, Heller A, DiStasio S, et al. Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation. *J Cell Biol*. 29 janv 2007;176(3):319-28.
297. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 29 juin 2007;129(7):1261-74.
298. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular Cell*. 1 juill 2002;10(1):151-62.
299. Mannoor K, Liao J, Jiang F. Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochim Biophys Acta*. août 2012;1826(1):121-8.
300. Mao Y-Q, Houry WA. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. *Front Mol Biosci [Internet]*. 2017 [cité 16 avr 2020];4. Disponible sur : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2017.00058/full#h11>
301. Markus SM, Taneja SS, Logan SK, Li W, Ha S, Hittelman AB, et al. Identification and characterization of ART-27, a novel coactivator for the androgen receptor N terminus. *Mol Biol Cell*. févr 2002;13(2):670-82.
302. Martínez-Fernández V, Garrido-Godino AI, Mirón-García MC, Begley V, Fernández-Pévida A, de la Cruz J, et al. Rpb5 modulates the RNA polymerase II transition from initiation to elongation by influencing Spt5 association and backtracking. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. janv 2018;1861(1):1-13.
303. Martino F, Pal M, Muñoz-Hernández H, Rodríguez CF, Núñez-Ramírez R, Gil-Carton D, et al. RPAP3 provides a flexible scaffold for coupling HSP90 to the human R2TP co-chaperone complex. *Nat Commun*. déc 2018;9(1):1501.
304. Massenet S, Bertrand E, Verheggen C. Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA Biology*. 3 juin 2017;14(6):680-92.
305. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. févr 2014;15(2):108-21.
306. Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. Crystal Structure of the Human AAA+ Protein RuvBL1. *J Biol Chem*. 15 déc 2006;281(50):38918-29.
307. Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem*. 15 déc 2006;281(50):38918-29.

308. Matsumoto S, Bandyopadhyay A, Kwiatkowski DJ, Maitra U, Matsumoto T. Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. juill 2002;161(3):1053-63.
309. Maurizy C, Quinternet M, Abel Y, Verheggen C, Santo PE, Bourguet M, et al. The RPAP3-Cterminal domain identifies R2TP-like quaternary chaperones. *Nat Commun*. déc 2018;9(1):2093.
310. Mayer MP, Le Breton L. Hsp90: breaking the symmetry. *Mol Cell*. 2 avr 2015;58(1):8-20.
311. McKeegan KS, Debieux CM, Watkins NJ. Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol Cell Biol*. sept 2009;29(18):4971-81.
312. McLaughlin M, Barker HE, Khan AA, Pedersen M, Dillon M, Mansfield DC, et al. HSP90 inhibition sensitizes head and neck cancer to platin-based chemoradiotherapy by modulation of the DNA damage response resulting in chromosomal fragmentation. *BMC Cancer*. 31 janv 2017;17(1):86.
313. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*. janv 2000;20(2):556-62.
314. Means JC, Venkatesan A, Gerdes B, Fan J-Y, Bjes ES, Price JL. *Drosophila* spaghetti and doubletime link the circadian clock and light to caspases, apoptosis and tauopathy. *PLoS Genet*. mai 2015;11(5):e1005171.
315. Ménard L, Taras D, Grigoletto A, Haurie V, Nicou A, Dugot-Senant N, et al. In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J Hepatol*. mai 2010;52(5):681-9.
316. Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene*. déc 2008;27 Suppl 2:S43-51.
317. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, et al. Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell*. 13 févr 2014;156(4):771-85.
318. Messina MP, Rauktys A, Lee L, Dabora SL. Tuberous sclerosis preclinical studies: timing of treatment, combination of a rapamycin analog (CCI-779) and interferon-gamma, and comparison of rapamycin to CCI-779. *BMC Pharmacol*. 6 nov 2007;7:14.
319. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, et al. Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Molecular Cell*. 1 mars 2003;11(3):647-58.
320. Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Mark Roe S, Vaughan CK, et al. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J*. 11 févr 2004;23(3):511-9.
321. Miller JM, Enemark EJ. Fundamental Characteristics of AAA+ Protein Family Structure and Function. *Archaea*. 2016;2016:1-12.
322. Millson SH, Vaughan CK, Zhai C, Ali MMU, Panaretou B, Piper PW, et al. Chaperone ligand-discrimination by the TPR-domain protein Tah1. *Biochemical Journal*. 26 juin 2008;413(2):261-8.
323. Milone MR, Pucci B, Colangelo T, Lombardi R, Iannelli F, Colantuoni V, et al. Proteomic characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) overexpressing or silenced colorectal cancer cells unveils a novel protein network associated with an aggressive phenotype. *Mol Oncol*. oct 2016;10(8):1344-62.
324. Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol*. févr 1994;14(2):1459-64.
325. Mir RA, Bele A, Mirza S, Srivastava S, Olou AA, Ammons SA, et al. A Novel Interaction of Ecdysoneless (ECD) Protein with R2TP Complex Component RUVBL1 Is Required for the Functional Role of ECD in Cell Cycle

Progression. *Mol Cell Biol.* 28 déc 2015;36(6):886-99.

326. Mita P, Savas JN, Ha S, Djouder N, Yates JR, Logan SK. Analysis of URI Nuclear Interaction with RPB5 and Components of the R2TP/Prefoldin-Like Complex. *PLoS One* [Internet]. 8 mai 2013 [cité 20 avr 2020];8(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648552/>

327. Miyata Y. Protein Kinase CK2 in Health and Disease. *Cell Mol Life Sci.* 1 juin 2009;66(11):1840-9.

328. Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Current Pharmaceutical Design.* 2013;19(3).

329. Miyata Y, Nishida E. Supervision of multiple signaling protein kinases by the CK2-Cdc37 couple, a possible novel cancer therapeutic target. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2004;1030:150-7.

330. Miyazaki M, McCarthy JJ, Esser KA. Insulin like growth factor-1-induced phosphorylation and altered distribution of tuberous sclerosis complex (TSC)1/TSC2 in C2C12 myotubes. *FEBS J.* mai 2010;277(9):2180-91.

331. Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu W-H, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science.* 16 janv 2004;303(5656):343-8.

332. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2010;22(2):132-9.

333. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 11 nov 2011;147(4):728-41.

334. Mo Q, Zhang Y, Jin X, Gao Y, Wu Y, Hao X, et al. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, increases paclitaxel-mediated toxicity in ovarian cancer cells through sustained activation of the p38/H2AX axis. *Tumour Biol.* nov 2016;37(11):14745-55.

335. Mollapour M, Bourbouli D, Beebe K, Woodford MR, Polier S, Hoang A, et al. Asymmetric Hsp90 N domain SUMOylation recruits Aha1 and ATP-competitive inhibitors. *Mol Cell.* 23 janv 2014;53(2):317-29.

336. Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2012;1823(3):648-55.

337. Mollapour M, Tsutsumi S, Donnelly AC, Beebe K, Tokita MJ, Lee M-J, et al. Swe1Wee1-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Hsp90 Regulates Distinct Facets of Chaperone Function. *Molecular Cell.* 12 févr 2010;37(3):333-43.

338. Mollapour M, Tsutsumi S, Truman AW, Xu W, Vaughan CK, Beebe K, et al. Threonine 22 Phosphorylation Attenuates Hsp90 Interaction with Cochaperones and Affects Its Chaperone Activity. *Molecular Cell.* 18 mars 2011;41(6):672-81.

339. Morgan RML, Pal M, Roe SM, Pearl LH, Prodromou C. Tah1 helix-swap dimerization prevents mixed Hsp90 co-chaperone complexes. *Acta Cryst D.* 1 mai 2015;71(5):1197-206.

340. Morgan RML, Hernández-Ramírez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, et al. Structure of the TPR domain of AIP: lack of client protein interaction with the C-terminal α -7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS One.* 2012;7(12):e53339.

341. Mori H, Inoue M, Yano M, Wakabayashi H, Kido H. 14-3-3tau associates with a translational control factor FKBP12-rapamycin-associated protein in T-cells after stimulation by pervanadate. *FEBS Lett.* 4 févr 2000;467(1):61-4.

342. Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, et al. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One.* 2014;9(2):e88891.

343. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* 1997;32:17-29.

344. Morimoto RI. Dynamic Remodeling of Transcription Complexes by Molecular Chaperones. *Cell*. 9 août 2002;110(3):281-4.
345. Morrison AJ, Shen X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juin 2009;10(6):373-84.
346. Morrison Joly M, Williams MM, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Young CD, et al. Two distinct mTORC2-dependent pathways converge on Rac1 to drive breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*. 30 juin 2017;19(1):74.
347. Moser C, Lang SA, Stoeltzing O. Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. juin 2009;29(6):2031-42.
348. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*. déc 2018;18(12):744-57.
349. Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonné R. Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol Cell*. avr 2002;9(4):891-901.
350. Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, et al. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*. juin 2013;32(25):3101-10.
351. Mumin NH, Drobnitzky N, Patel A, Lourenco LM, Cahill FF, Jiang Y, et al. Overcoming acquired resistance to HSP90 inhibition by targeting JAK-STAT signalling in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 24 janv 2019;19(1):102.
352. Muñoz-Hernández H, Pal M, Rodríguez CF, Fernandez-Leiro R, Prodromou C, Pearl LH, et al. Structural mechanism for regulation of the AAA-ATPases RUVBL1-RUVBL2 in the R2TP co-chaperone revealed by cryo-EM. *Sci Adv [Internet]*. 1 mai 2019 [cité 28 avr 2020];5(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6494491/>
353. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. août 2004;24(15):6710-8.
354. Murphy PJ, Kanelakis KC, Galigniana MD, Morishima Y, Pratt WB. Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate. *J Biol Chem*. 10 août 2001;276(32):30092-8.
355. Murtagh J, Lu H, Schwartz EL. Taxotere-Induced Inhibition of Human Endothelial Cell Migration Is a Result of Heat Shock Protein 90 Degradation. *Cancer Res*. 15 août 2006;66(16):8192-9.
356. Murugan AK. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Seminars in Cancer Biology*. 1 déc 2019;59:92-111.
357. Murugan AK, Alzahrani A, Xing M. Mutations in critical domains confer the human mTOR gene strong tumorigenicity. *J Biol Chem*. 1 mars 2013;288(9):6511-21.
358. Nada S, Hondo A, Kasai A, Koike M, Saito K, Uchiyama Y, et al. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J*. 4 mars 2009;28(5):477-89.
359. Nagaraju GP, Long T-E, Park W, Landry JC, Taliaferro-Smith L, Farris AB, et al. Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer. *Mol Carcinog*. oct 2015;54(10):1147-58.
360. Nagaraju GP, Zakka KM, Landry JC, Shaib WL, Lesinski GB, El-Rayes BF. Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 15 sept 2019;145(6):1529-37.
361. Nakashima A, Yoshino K, Miyamoto T, Eguchi S, Oshiro N, Kikkawa U, et al. Identification of TBC7 having

TBC domain as a novel binding protein to TSC1–TSC2 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 14 sept 2007;361(1):218-23.

362. Nano N, Houry WA. Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Phil Trans R Soc B*. 5 mai 2013;368(1617):20110399.

363. Napetschnig J, Wu H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42(1):443-68.

364. Narayanan U, Achsel T, Lührmann R, Matera AG. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol Cell*. 22 oct 2004;16(2):223-34.

365. Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin Cancer Res*. 1 janv 2012;18(1):64-76.

366. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 22 sept 1994;371(6495):297-300.

367. Nellist M, Verhaaf B, Goedbloed MA, Reuser AJ, van den Ouweland AM, Halley DJ. TSC2 missense mutations inhibit tuberin phosphorylation and prevent formation of the tuberin-hamartin complex. *Hum Mol Genet*. 1 déc 2001;10(25):2889-98.

368. Nellist M, Goedbloed MA, de Winter C, Verhaaf B, Jankie A, Reuser AJ, et al. Identification and characterization of the interaction between tuberin and 14-3-3zeta. *J Biol Chem*. 18 oct 2002;277(42):39417-24.

369. Neuman NA, Henske EP. Non-canonical functions of the tuberous sclerosis complex-Rheb signalling axis. *EMBO Mol Med*. avr 2011;3(4):189-200.

370. Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Res*. 1 janv 1999;9(1):27-43.

371. Nguyen THD, Galej WP, Bai X, Savva CG, Newman AJ, Scheres SHW, et al. The architecture of the spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP. *Nature*. 2 juill 2015;523(7558):47-52.

372. Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, et al. RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;106(5):920-8.

373. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell*. août 2002;2(2):157-64.

374. Nicolet CM, Craig EA. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1 sept 1989;9(9):3638-46.

375. Noguchi M, Yu D, Hirayama R, Ninomiya Y, Sekine E, Kubota N, et al. Inhibition of homologous recombination repair in irradiated tumor cells pretreated with Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 22 déc 2006;351(3):658-63.

376. Nottrott S, Urlaub H, Lührmann R. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J*. 15 oct 2002;21(20):5527-38.

377. Novotný I, Malinová A, Stejskalová E, Matějů D, Klimešová K, Roithová A, et al. SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Rep*. 20 janv 2015;10(3):429-40.

378. Nwachukwu JC, Mita P, Ruoff R, Ha S, Wang Q, Huang SJ, et al. Genome-wide impact of androgen receptor trapped clone-27 loss on androgen-regulated transcription in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 1 avr 2009;69(7):3140-7.

379. Ohkubo S, Kodama Y, Muraoka H, Hitotsumachi H, Yoshimura C, Kitade M, et al. TAS-116, a Highly Selective Inhibitor of Heat Shock Protein 90 α and β , Demonstrates Potent Antitumor Activity and Minimal Ocular Toxicity in Preclinical Models. *Mol Cancer Ther*. 1 janv 2015;14(1):14-22.

380. Ohne Y, Takahara T, Hatakeyama R, Matsuzaki T, Noda M, Mizushima N, et al. Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem.* 14 nov 2008;283(46):31861-70.
381. Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic Transport: The Last 200 Nanometers. *Cell.* 6 févr 1998;92(3):327-36.
382. Ojha S, Malla S, Lyons SM. snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules.* mai 2020;10(5):783.
383. Okosun J, Wolfson RL, Wang J, Araf S, Wilkins L, Castellano BM, et al. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. *Nat Genet.* févr 2016;48(2):183-8.
384. Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, et al. Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature.* 4 déc 2008;456(7222):611-6.
385. Paci A, Liu XH, Huang H, Lim A, Houry WA, Zhao R. The stability of the small nucleolar ribonucleoprotein (snoRNP) assembly protein Pih1 in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by its C terminus. *J Biol Chem.* 21 déc 2012;287(52):43205-14.
386. Pajares MÁ. PDRG1 at the interface between intermediary metabolism and oncogenesis. *World J Biol Chem.* 26 nov 2017;8(4):175-86.
387. Pal M, Morgan M, Phelps SEL, Roe SM, Parry-Morris S, Downs JA, et al. Structural Basis for Phosphorylation-Dependent Recruitment of Tel2 to Hsp90 by Pih1. *Structure.* juin 2014;22(6):805-18.
388. Palm W, Park Y, Wright K, Pavlova NN, Tuveson DA, Thompson CB. The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed by mTORC1. *Cell.* 16 juill 2015;162(2):259-70.
389. Pan X, Eathiraj S, Munson M, Lambright DG. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature.* 20 juill 2006;442(7100):303-6.
390. Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO Journal.* 1998;17(16):4829-36.
391. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, et al. Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell.* déc 2002;10(6):1307-18.
392. Panepinto JC, Oliver BG, Amlung TW, Askew DS, Rhodes JC. Expression of the *Aspergillus fumigatus* rheb homologue, rhbA, is induced by nitrogen starvation. *Fungal Genet Biol.* août 2002;36(3):207-14.
393. Patel HJ, Modi S, Chiosis G, Taldone T. Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin Drug Discov.* mai 2011;6(5):559-87.
394. Patel K, Wen J, Magliocca K, Muller S, Liu Y, Chen ZG, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) is overexpressed in p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, and its inhibition in vitro potentiates the effects of chemoradiation. *Cancer Chemother Pharmacol.* nov 2014;74(5):1015-22.
395. Patel PH, Thapar N, Guo L, Martinez M, Maris J, Gau C-L, et al. *Drosophila* Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *J Cell Sci.* 1 sept 2003;116(Pt 17):3601-10.
396. Pati UK, Weissman SM. Isolation and molecular characterization of a cDNA encoding the 23-kDa subunit of human RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 5 août 1989;264(22):13114-21.
397. Paull TT, Lee J-H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle.* juin 2005;4(6):737-40.
398. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, et al. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J.* 1 août 2007;405(3):513-22.

399. Perry J, Kleckner N. The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell*. 24 janv 2003;112(2):151-5.
400. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 29 mai 2009;137(5):873-86.
401. Petukhov M, Dagkessamanskaja A, Bommer M, Barrett T, Tsaneva I, Yakimov A, et al. Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases. *Structure*. 8 août 2012;20(8):1321-31.
402. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *CMLS, Cell Mol Life Sci*. oct 2002;59(10):1640-8.
403. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal*. 2001;15(7):1118-31.
404. Pittet J-F, Lee H, Pespeni M, O'Mahony A, Roux J, Welch WJ. Stress-Induced Inhibition of the NF- κ B Signaling Pathway Results from the Insolubilization of the I κ B Kinase Complex following Its Dissociation from Heat Shock Protein 90. *The Journal of Immunology*. 1 janv 2005;174(1):384-94.
405. Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res*. 1 nov 1998;58(21):4766-70.
406. Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, et al. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten $^{+/-}$ mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 août 2001;98(18):10320-5.
407. Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell*. 4 mai 2001;105(3):357-68.
408. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature Cell Biology*. sept 2002;4(9):658-65.
409. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Letters*. 2007;581(19):3758-69.
410. Pratt WB. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*. avr 1998;217(4):420-34.
411. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of Glucocorticoid Receptors. In: Starke K, Gaestel M, éditeurs. *Molecular Chaperones in Health and Disease* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006 [cité 10 mars 2021]. p. 111-38. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/3-540-29717-0_5
412. Prieto MB, Georg RC, Gonzales-Zubieta FA, Luz JS, Oliveira CC. Nop17 is a key R2TP factor for the assembly and maturation of box C/D snoRNP complex. *BMC Molecular Biol*. déc 2015;16(1):7.
413. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, et al. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular « clamp » via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*. 15 août 2000;19(16):4383-92.
414. Prodromou C. The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823(3):614-23.
415. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J*. 15 août 2016;473(16):2439-52.
416. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell*. 11 juill 1997;90(1):65-75.
417. Putnam CD, Clancy SB, Tsuruta H, Gonzalez S, Wetmur JG, Tainer JA. Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol*. 10 août 2001;311(2):297-310.

418. Qin J, Wang Z, Hoogeveen-Westerveld M, Shen G, Gong W, Nellist M, et al. Structural Basis of the Interaction between Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7) *. *Journal of Biological Chemistry*. 15 avr 2016;291(16):8591-601.
419. Qiu X-B, Lin Y-L, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, et al. An Eukaryotic RuvB-like Protein (RUVBL1) Essential for Growth. *J Biol Chem*. 23 oct 1998;273(43):27786-93.
420. Quanz M, Herbette A, Sayarath M, Koning L de, Dubois T, Sun J-S, et al. Heat Shock Protein 90 α (Hsp90 α) Is Phosphorylated in Response to DNA Damage and Accumulates in Repair Foci *. *Journal of Biological Chemistry*. 16 mars 2012;287(12):8803-15.
421. Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*. juin 2002;417(6889):618-24.
422. Quinternet M, Rothé B, Barbier M, Bobo C, Saliou J-M, Jacquemin C, et al. Structure/Function Analysis of Protein-Protein Interactions Developed by the Yeast Pih1 Platform Protein and Its Partners in Box C/D snoRNP Assembly. *J Mol Biol*. 28 août 2015;427(17):2816-39.
423. Radli M, Rüdiger SGD. Dancing with the Diva: Hsp90–Client Interactions. *Journal of Molecular Biology*. 14 sept 2018;430(18, Part B):3029-40.
424. Radovic S, Rapisarda VA, Tosato V, Bruschi CV. Functional and comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RVB1 and RVB2 genes with bacterial Ruv homologues. *FEMS Yeast Res*. 1 juin 2007;7(4):527-39.
425. Rao F, Cha J, Xu J, Xu R, Vandiver MS, Tyagi R, et al. Inositol pyrophosphates mediate the DNA-PK/ATM-53 cell death pathway by regulating CK2 phosphorylation of Tti1/Tel2. *Mol Cell*. 10 avr 2014;54(1):119-32.
426. Rashid S, Pilecka I, Torun A, Olchowik M, Bielinska B, Miaczynska M. Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of beta-catenin/TCF-mediated transcription. *J Biol Chem*. 3 juill 2009;284(27):18115-28.
427. Raymond A-A, Benhamouche S, Neaud V, Di Martino J, Javary J, Rosenbaum J. Reptin regulates DNA double strand breaks repair in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123333.
428. Rehmann H, Brüning M, Berghaus C, Schwarten M, Köhler K, Stocker H, et al. Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. *FEBS Lett*. 3 sept 2008;582(20):3005-10.
429. Reiling JH, Hafen E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1 déc 2004;18(23):2879-92.
430. Reinke A, Chen JC-Y, Aronova S, Powers T. Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J Biol Chem*. 20 oct 2006;281(42):31616-26.
431. Ren J, Li W, Liu H, Yan L, Jiao W, Li D, et al. Overexpression of reptin in renal cell carcinoma contributes to tumor malignancies and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Urol Oncol*. oct 2013;31(7):1358-66.
432. Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H, et al. Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO reports*. 1 oct 2009;10(10):1147-53.
433. Richard P, Darzacq X, Bertrand E, Jády BE, Verheggen C, Kiss T. A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *EMBO J*. 15 août 2003;22(16):4283-93.
434. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 3 févr 2005;433(7025):477-80.
435. Rivera-Calzada A, Pal M, Muñoz-Hernández H, Luque-Ortega JR, Gil-Carton D, Degliesposti G, et al. The Structure of the R2TP Complex Defines a Platform for Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular

Chaperone System. Structure. 5 juill 2017;25(7):1145-1152.e4.

436. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov.* août 2011;1(3):248-59.

437. Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, et al. Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature.* 9 juin 2016;534(7606):272-6.

438. Roe SM, Ali MMU, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, et al. The Mechanism of Hsp90 Regulation by the Protein Kinase-Specific Cochaperone p50cdc37. *Cell.* 9 janv 2004;116(1):87-98.

439. Röhl A, Rohrberg J, Buchner J. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem Sci.* mai 2013;38(5):253-62.

440. Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, Houry WA, Hube O, Hupp TR, et al. The Emergence of the Conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the Signaling Landscape. *Sci Signal.* 12 mars 2013;6(266):mr1.

441. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* nov 2019;20(11):665-80.

442. Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Hengstschläger M. The tuberous sclerosis gene products hamartin and tuberin are multifunctional proteins with a wide spectrum of interacting partners. *Mutat Res.* avr 2008;658(3):234-46.

443. Rothé B, Saliou J-M, Quinternet M, Back R, Tiotiu D, Jacquemin C, et al. Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(16):10731-47.

444. Rousseau B, Ménard L, Haurie V, Taras D, Blanc J-F, Moreau-Gaudry F, et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1 oct 2007;46(4):1108-18.

445. Russell LC, Whitt SR, Chen MS, Chinkers M. Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J Biol Chem.* 16 juill 1999;274(29):20060-3.

446. Russell RC, Fang C, Guan K-L. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development.* août 2011;138(16):3343-56.

447. Rutherford SL, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* nov 1998;396(6709):336-42.

448. Saeki M, Irie Y, Ni L, Yoshida M, Itsuki Y, Kamisaki Y. Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 avr 2006;342(2):568-72.

449. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* oct 2013;14(10):630-42.

450. Sakurai H, Enoki Y. Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *The FEBS Journal.* 2010;277(20):4140-9.

451. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 16 avr 2010;141(2):290-303.

452. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 13 juin 2008;320(5882):1496-501.

453. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 23 mars 2007;25(6):903-15.

454. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano J, Saint F, Cordon-Cardo C. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol.* 10 févr 2006;24(5):778-89.
455. Sánchez-Morgan N, Kirsch KH, Trackman PC, Sonenshein GE. UXT Is a LOX-PP Interacting Protein That Modulates Estrogen Receptor Alpha Activity in Breast Cancer Cells. *J Cell Biochem.* août 2017;118(8):2347-56.
456. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 27 juill 2004;14(14):1296-302.
457. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 18 févr 2005;307(5712):1098-101.
458. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 21 avr 2006;22(2):159-68.
459. Sartori E, Langer R, Vassella E, Hewer E, Schucht P, Zlobec I, et al. Low co-expression of epidermal growth factor receptor and its chaperone heat shock protein 90 is associated with worse prognosis in primary glioblastoma, IDH-wild-type. *Oncol Rep.* oct 2017;38(4):2394-400.
460. Sato N, Koinuma J, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, et al. Activation of an oncogenic TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2010;49(4):353-67.
461. Sato T, Nakashima A, Guo L, Tamanai F. Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *J Biol Chem.* 8 mai 2009;284(19):12783-91.
462. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol.* juin 2003;5(6):566-71.
463. Sauvage F, Messaoudi S, Fattal E, Barratt G, Vergnaud-Gauduchon J. Heat shock proteins and cancer: How can nanomedicine be harnessed? *J Control Release.* 28 févr 2017;248:133-43.
464. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;169(2):361-71.
465. Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T, Lührmann R. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J.* 4 août 2004;23(15):3000-9.
466. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, et al. Structure of TPR Domain–Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70–Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell.* 14 avr 2000;101(2):199-210.
467. Schmid TE, Multhoff G. Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. *Curr Med Chem.* 2012;19(12):1765-70.
468. Schmidt KM, Dietrich P, Hackl C, Guenzle J, Bronsert P, Wagner C, et al. Inhibition of mTORC2/RICTOR Impairs Melanoma Hepatic Metastasis. *Neoplasia.* déc 2018;20(12):1198-208.
469. Schmitz G, Schmidt M, Feierabend J. Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descendance and analysis of its mRNA and protein expression. *Plant Mol Biol.* févr 1996;30(3):479-92.
470. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* juin 2017;18(6):345-60.
471. Schuler B, Hofmann H. Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics—expanding scope and timescales. *Current Opinion in Structural Biology.* 1 févr 2013;23(1):36-47.

472. Schultz A, Nottrott S, Hartmuth K, Lührmann R. RNA structural requirements for the association of the spliceosomal hPrp31 protein with the U4 and U4atac small nuclear ribonucleoproteins. *J Biol Chem.* 22 sept 2006;281(38):28278-86.
473. Schulze A, Beliu G, Helmerich DA, Schubert J, Pearl LH, Prodromou C, et al. Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism. *Nat Chem Biol.* août 2016;12(8):628-35.
474. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, et al. An Acetylation Site in the Middle Domain of Hsp90 Regulates Chaperone Function. *Molecular Cell.* 12 janv 2007;25(1):151-9.
475. Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 1 juill 2000;60(13):3504-13.
476. Sethurathinam S, Singh LP, Panneerselvam P, Byrne B, Ding JL. UXT plays dual opposing roles on SARM-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 11 oct 2013;587(20):3296-302.
477. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2013;14(5):283-96.
478. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell.* juill 2004;6(1):91-9.
479. Shelton SN, Shawgo ME, Matthews SB, Lu Y, Donnelly AC, Szabla K, et al. KU135, a Novel Novobiocin-Derived C-Terminal Inhibitor of the 90-kDa Heat Shock Protein, Exerts Potent Antiproliferative Effects in Human Leukemic Cells. *Mol Pharmacol.* déc 2009;76(6):1314-22.
480. Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature.* août 2000;406(6795):541-4.
481. Shevchenko A, Roguev A, Schaft D, Buchanan L, Habermann B, Sakalar C, et al. Chromatin Central: towards the comparative proteome by accurate mapping of the yeast proteomic environment. *Genome Biol.* nov 2008;9(11):1-22.
482. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* mars 2003;3(3):155-68.
483. Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell.* mai 1992;69(3):457-70.
484. Shiota C, Woo J-T, Lindner J, Shelton KD, Magnuson MA. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell.* oct 2006;11(4):583-9.
485. Siegert R, Leroux MR, Scheufler C, Hartl FU, Moarefi I. Structure of the Molecular Chaperone Prefoldin: Unique Interaction of Multiple Coiled Coil Tentacles with Unfolded Proteins. *Cell.* 10 nov 2000;103(4):621-32.
486. Sigala B, Edwards M, Puri T, Tsaneva IR. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Exp Cell Res.* 1 nov 2005;310(2):357-69.
487. Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, Hieter P. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell.* janv 1990;60(2):307-17.
488. Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, et al. Regulation of Hsp90 ATPase Activity by the Co-chaperone Cdc37p/p50cdc37*. *Journal of Biological Chemistry.* 7 juin 2002;277(23):20151-9.
489. Silva-Martin N, Daudén MI, Glatt S, Hoffmann NA, Kastritis P, Bork P, et al. The Combination of X-Ray Crystallography and Cryo-Electron Microscopy Provides Insight into the Overall Architecture of the Dodecameric Rvb1/Rvb2 Complex. *San Martin C, éditeur. PLoS ONE.* 8 janv 2016;11(1):e0146457.

490. Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, et al. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem*. 12 mars 2010;285(11):7866-79.
491. Song H-O, Lee W, An K, Lee H, Cho JH, Park Z-Y, et al. C. elegans STI-1, the Homolog of Sti1/Hop, Is Involved in Aging and Stress Response. *Journal of Molecular Biology*. 24 juill 2009;390(4):604-17.
492. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*. mai 1991;65(3):363-6.
493. Soutourina J, Bordas-Le Floch V, Gendrel G, Flores A, Ducrot C, Dumay-Odelot H, et al. Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Mol Cell Biol*. juill 2006;26(13):4920-33.
494. Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, et al. Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature*. 4 févr 2010;463(7281):662-5.
495. Staněk D, Neugebauer KM. Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol*. 27 sept 2004;166(7):1015-25.
496. Staněk D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *Journal of Cell Biology*. 10 févr 2003;160(4):505-16.
497. Stephanou A, Isenberg DA, Nakajima K, Latchman DS. Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90beta gene promoters. *J Biol Chem*. 15 janv 1999;274(3):1723-8.
498. Stephanou A, Latchman DS. Transcriptional Regulation of the Heat Shock Protein Genes by STAT Family Transcription Factors. *Gene Expr*. 1999;7(4-5-6):311-9.
499. Stevens SW, Barta I, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, et al. Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6 x U5 small nuclear ribonucleoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. nov 2001;7(11):1543-53.
500. Stocker H, Radimerski T, Schindelhof B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. juin 2003;5(6):559-65.
501. Strub A, Lim JH, Pfanner N, Voos W. The mitochondrial protein import motor. *Biol Chem*. oct 2000;381(9-10):943-9.
502. Sugimoto K. Branching the Tel2 pathway for exact fit on phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases. *Current Genetics*. 1 oct 2018;64.
503. Sun J, Yin B, Tang S, Zhang X, Xu J, Bao E. Vitamin C mitigates heat damage by reducing oxidative stress, inducing HSP expression in TM4 Sertoli cells. *Molecular Reproduction and Development*. 2019;86(6):673-85.
504. Sun S, Tang Y, Lou X, Zhu L, Yang K, Zhang B, et al. UXT is a novel and essential cofactor in the NF-kappaB transcriptional enhanceosome. *J Cell Biol*. 16 juill 2007;178(2):231-44.
505. Sun W, Zhu YJ, Wang Z, Zhong Q, Gao F, Lou J, et al. Crystal structure of the yeast TSC1 core domain and implications for tuberous sclerosis pathological mutations. *Nat Commun*. 2013;4:2135.
506. Synoradzki K, Bieganowski P. Middle domain of human Hsp90 isoforms differentially binds Aha1 in human cells and alters Hsp90 activity in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015;1853(2):445-52.
507. Taberner J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 1 avr 2008;26(10):1603-10.
508. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights.

Nature Reviews Molecular Cell Biology. juill 2010;11(7):515-28.

509. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*. 31 août 2012;150(5):987-1001.

510. Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H, Lange T de. Tel2 Regulates the Stability of PI3K-Related Protein Kinases. *Cell*. 28 déc 2007;131(7):1248-59.

511. Takai H, Xie Y, Lange T de, Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev*. 15 sept 2010;24(18):2019-30.

512. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. janv 2001;81(1):153-208.

513. Taneja SS, Ha S, Swenson NK, Torra IP, Rome S, Walden PD, et al. ART-27, an androgen receptor coactivator regulated in prostate development and cancer. *J Biol Chem*. 2 avr 2004;279(14):13944-52.

514. Tao Z, Chen S, Mao G, Xia H, Huang H, Ma H. The PDRG1 is an oncogene in lung cancer cells, promoting radioresistance via the ATM-P53 signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. oct 2016;83:1471-7.

515. Tapia MD, Sow SO, Lyke KE, Haidara FC, Diallo F, Doumbia M, et al. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. janv 2016;16(1):31-42.

516. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. The Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell*. 4 mai 2001;105(3):345-55.

517. Taubert S, Gorrini C, Frank SR, Parisi T, Fuchs M, Chan H-M, et al. E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol*. mai 2004;24(10):4546-56.

518. Te J, Jia L, Rogers J, Miller A, Hartson SD. Novel Subunits of the Mammalian Hsp90 Signal Transduction Chaperone. *J Proteome Res*. mai 2007;6(5):1963-73.

519. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct 2002;99(21):13571-6.

520. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*. 5 août 2003;13(15):1259-68.

521. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, et al. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*. 21 nov 2007;2(11):e1217.

522. Theodoraki MA, Caplan AJ. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta*. mars 2012;1823(3):683-8.

523. Theurillat J-P, Metzler SC, Henzi N, Djouder N, Helbling M, Zimmermann A-K, et al. URI is an oncogene amplified in ovarian cancer cells and is required for their survival. *Cancer Cell*. 8 mars 2011;19(3):317-32.

524. Thien A, Prentzell MT, Holzwarth B, Kläsener K, Kuper I, Boehlke C, et al. TSC1 activates TGF- β -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell*. 9 mars 2015;32(5):617-30.

525. Thomanetz V, Angliker N, Cloëtta D, Lustenberger RM, Schweighauser M, Oliveri F, et al. Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J Cell Biol*. 15 avr 2013;201(2):293-308.

526. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. 20 mars 2009;284(12):8023-32.

527. Tian S, Yu G, He H, Zhao Y, Liu P, Marshall AG, et al. Pih1p-Tah1p Puts a Lid on Hexameric AAA+ ATPases Rvb1/2p. *Structure*. 3 oct 2017;25(10):1519-1529.e4.
528. Tosi A, Haas C, Herzog F, Gilmozzi A, Berninghausen O, Ungewickell C, et al. Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex. *Cell*. 12 sept 2013;154(6):1207-19.
529. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer*. août 2010;10(8):537-49.
530. Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: A role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Science*. 2007;98(10):1536-9.
531. Tung C-W, Wu M-T, Chen Y-K, Wu C-C, Chen W-C, Li H-P, et al. Identification of biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma using feature selection and decision tree methods. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:782031.
532. Turner IA, Norman CM, Churcher MJ, Newman AJ. Dissection of Prp8 protein defines multiple interactions with crucial RNA sequences in the catalytic core of the spliceosome. *RNA*. mars 2006;12(3):375-86.
533. Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW, Willingham M, Appella E. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *PNAS*. 1 mai 1986;83(10):3121-5.
534. Urano J, Tabancay AP, Yang W, Tamanoi F. The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein is involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake. *J Biol Chem*. 14 avr 2000;275(15):11198-206.
535. Urano J, Sato T, Matsuo T, Otsubo Y, Yamamoto M, Tamanoi F. Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 févr 2007;104(9):3514-9.
536. Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, et al. Prefoldin, a Chaperone that Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin. *Cell*. 29 mai 1998;93(5):863-73.
537. van Nues RW, Beggs JD. Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. avr 2001;157(4):1451-67.
538. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*. 8 août 1997;277(5327):805-8.
539. van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, et al. Interaction Between Hamartin and Tuberin, the TSC1 and TSC2 Gene Products. *Human Molecular Genetics*. 1 juin 1998;7(6):1053-7.
540. Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. mars 2007;9(3):316-23.
541. Vaughan CK. Hsp90 Picks PIKKs via R2TP and Tel2. *Structure*. 10 juin 2014;22(6):799-800.
542. Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, Good VM, Ali MMU, Prodromou C, et al. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 Complex. *Molecular Cell*. 1 sept 2006;23(5):697-707.
543. Vaughan CK, Mollapour M, Smith JR, Truman A, Hu B, Good VM, et al. Hsp90-Dependent Activation of Protein Kinases Is Regulated by Chaperone-Targeted Dephosphorylation of Cdc37. *Molecular Cell*. 26 sept 2008;31(6):886-95.
544. Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*. 21 mars 2008;132(6):945-57.
545. Verba KA, Agard DA. How Hsp90 and Cdc37 Lubricate Kinase Molecular Switches. *Trends Biochem Sci*. oct

2017;42(10):799-811.

546. Verba KA, Wang RY-R, Arakawa A, Liu Y, Shirouzu M, Yokoyama S, et al. Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. *Science*. 24 juin 2016;352(6293):1542-7.

547. Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1 juin 2012;76(2):115-58.

548. Vidovic I, Nottrott S, Hartmuth K, Lührmann R, Ficner R. Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol Cell*. déc 2000;6(6):1331-42.

549. Voellmy R. The stress protein response: consequences of stress exposure—cytoprotection—potential diagnostic and therapeutic applications. *Methods*. 2005;35(2):115-6.

550. von Morgen P, Burdova K, Flower TG, O'Reilly NJ, Boulton SJ, Smerdon SJ, et al. MRE11 stability is regulated by CK2-dependent interaction with R2TP complex. *Oncogene*. août 2017;36(34):4943-50.

551. von Morgen P, Hořejší Z, Macurek L. Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Front Genet* [Internet]. 25 févr 2015 [cité 8 avr 2020];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4341119/>

552. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1982;1(8):945-51.

553. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2 avr 2002;41(7):1098-113.

554. Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, et al. The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy. *PNAS*. 15 déc 2009;106(50):21288-93.

555. Wang X, Fonseca BD, Tang H, Liu R, Elia A, Clemens MJ, et al. Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biol Chem*. 7 nov 2008;283(45):30482-92.

556. Wang Y, Liu H, Diao L, Potter A, Zhang J, Qiao Y, et al. Hsp90 Inhibitor Ganetespib Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer to Radiation but Has Variable Effects with Chemoradiation. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2016;22(23):5876-86.

557. Wang Y, Garabedian MJ, Logan SK. UR11 amplification in uterine carcinosarcoma associates with chemoresistance and poor prognosis. *Am J Cancer Res*. 2015;5(7):2320-9.

558. Watkins NJ, Ségault V, Charpentier B, Nottrott S, Fabrizio P, Bachi A, et al. A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell*. 27 oct 2000;103(3):457-66.

559. Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci*. 15 juill 2005;118(Pt 14):3117-29.

560. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1. *Science*. 20 févr 2009;323(5917):1063-6.

561. Whitehead SE, Jones KW, Zhang X, Cheng X, Terns RM, Terns MP. Determinants of the Interaction of the Spinal Muscular Atrophy Disease Protein SMN with the Dimethylarginine-modified Box H/ACA Small Nucleolar Ribonucleoprotein GAR1 *. *Journal of Biological Chemistry*. 13 déc 2002;277(50):48087-93.

562. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*. oct 2005;5(10):761-72.

563. Wiech M, Olszewski MB, Tracz-Gaszewska Z, Wawrzynow B, Zylicz M, Zylicz A. Molecular mechanism of

mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One*. 2012;7(12):e51426.

564. Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res*. 1995;1:53-71.

565. Wienecke R, König A, DeClue JE. Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J Biol Chem*. 7 juill 1995;270(27):16409-14.

566. Willhoft O, Bythell-Douglas R, McCormack EA, Wigley DB. Synergy and antagonism in regulation of recombinant human INO80 chromatin remodeling complex. *Nucleic Acids Res*. 30 sept 2016;44(17):8179-88.

567. Willhoft O, Wigley DB. INO80 and SWR1 complexes: the non-identical twins of chromatin remodelling. *Current Opinion in Structural Biology*. avr 2020;61:50-8.

568. Woo S-Y, Kim D-H, Jun C-B, Kim Y-M, Haar EV, Lee S, et al. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*. 31 août 2007;282(35):25604-12.

569. Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell*. févr 2000;5(2):321-30.

570. Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, et al. A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2007;14(12):1165-72.

571. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 10 févr 2006;124(3):471-84.

572. Xiao GH, Shoarinejad F, Jin F, Golemis EA, Yeung RS. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem*. 7 mars 1997;272(10):6097-100.

573. Xiao X, Wang W, Li Y, Yang D, Li X, Shen C, et al. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 28 août 2018;37(1):201.

574. Xu C, Bian C, Lam R, Dong A, Min J. The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nat Commun*. 2011;2:227.

575. Xu W, Mollapour M, Prodromou C, Wang S, Scroggins BT, Palchick Z, et al. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Mol Cell*. 10 août 2012;47(3):434-43.

576. Yamada K, Kunishima N, Mayanagi K, Ohnishi T, Nishino T, Iwasaki H, et al. Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 févr 2001;98(4):1442-7.

577. Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, et al. *rheb*, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem*. 10 juin 1994;269(23):16333-9.

578. Yamashita A, Kashima I, Ohno S. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta*. 30 déc 2005;1754(1-2):305-15.

579. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. 21 déc 2017;552(7685):368-73.

580. Yang H, Yu Z, Chen X, Li J, Li N, Cheng J, et al. Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. *Nature Communications*. 12 janv 2021;12(1):339.

581. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan K-L. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for

complex formation and kinase activity. *Genes Dev.* 15 oct 2006;20(20):2820-32.

582. Yang S, Wang H, Guo Y, Chen S, Zhang M-Y, Shen J, et al. RMP plays distinct roles in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and normal hepatic cells. *Int J Biol Sci.* 2013;9(6):637-48.

583. Yang W, Tabancay AP, Urano J, Tamanoi F. Failure to farnesylate Rheb protein contributes to the enrichment of G0/G1 phase cells in the *Schizosaccharomyces pombe* farnesyltransferase mutant. *Mol Microbiol.* sept 2001;41(6):1339-47.

584. Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Fiskus W, Nechtman J, et al. Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer Res.* 15 juin 2008;68(12):4833-42.

585. Yao M, Rogers L, Suchowerska N, Choe D, Al-Dabbas MA, Narula RS, et al. Sensitization of prostate cancer to radiation therapy: Molecules and pathways to target. *Radiother Oncol.* août 2018;128(2):283-300.

586. Yenerall P, Das AK, Wang S, Kollipara RK, Li LS, Villalobos P, et al. RUVBL1/RUVBL2 ATPase Activity Drives PAQosome Maturation, DNA Replication and Radioresistance in Lung Cancer. *Cell Chemical Biology.* 16 janv 2020;27(1):105-121.e14.

587. Yin J, Luo W, Zeng X, Zeng L, Li Z, Deng X, et al. UXT-AS1-induced alternative splicing of UXT is associated with tumor progression in colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(3):462-72.

588. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* 11 juin 2010;38(5):768-74.

589. Yoshida M, Saeki M, Egusa H, Irie Y, Kamano Y, Uraguchi S, et al. RPAP3 splicing variant isoform 1 interacts with PIH1D1 to compose R2TP complex for cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 4 janv 2013;430(1):320-4.

590. Zacharek SJ, Xiong Y, Shumway SD. Negative regulation of TSC1-TSC2 by mammalian D-type cyclins. *Cancer Res.* 15 déc 2005;65(24):11354-60.

591. Zaidi SH, Huddart RA, Harrington KJ. Novel targeted radiosensitisers in cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol.* juin 2009;6(2):103-34.

592. Zaros C, Briand J-F, Boulard Y, Labarre-Mariotte S, Garcia-Lopez MC, Thuriaux P, et al. Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):634-47.

593. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, Huang Y, Williams DR, Hollmig K, et al. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood.* 15 févr 2007;109(4):1692-700.

594. Zhang J, Pan Y-F, Ding Z-W, Yang G-Z, Tan Y-X, Yang C, et al. RMP promotes venous metastases of hepatocellular carcinoma through promoting IL-6 transcription. *Oncogene.* mars 2015;34(12):1575-83.

595. Zhang J, Kim J, Alexander A, Cai S, Tripathi DN, Dere R, et al. A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nat Cell Biol.* oct 2013;15(10):1186-96.

596. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol.* juin 2003;5(6):578-81.

597. Zhao H, Wang Q, Zhang H, Liu Q, Du X, Richter M, et al. UXT Is a Novel Centrosomal Protein Essential for Cell Viability. *MBoC.* 2005;16(12):5857-65.

598. Zhao R, Davey M, Hsu Y-C, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, et al. Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone. *Cell.* mars 2005;120(5):715-27.

599. Zhao R, Kakihara Y, Gribun A, Huen J, Yang G, Khanna M, et al. Molecular chaperone Hsp90 stabilizes

Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol.* 11 févr 2008;180(3):563-78.

600. Zhao Y-G, Gilmore R, Leone G, Coffey MC, Weber B, Lee PWK. Hsp90 Phosphorylation Is Linked to Its Chaperoning Function: ASSEMBLY OF THE REOVIRUS CELL ATTACHMENT PROTEIN *. *Journal of Biological Chemistry.* 1 août 2001;276(35):32822-7.

601. Zhou CY, Stoddard CI, Johnston JB, Trnka MJ, Echeverria I, Palovcak E, et al. Regulation of Rvb1/Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones. *Cell Reports.* 6 juin 2017;19(10):2033-44.

602. Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci.* févr 2011;12(1):30-42.

603. Zhou W, Wang Q, Xu Y, Jiang J, Guo J, Yu H, et al. RMP promotes epithelial-mesenchymal transition through NF- κ B/CSN2/Snail pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 20 juin 2017;8(25):40373-88.

604. Zhou Y, Ge R, Wang R, Liu F, Huang Y, Liu H, et al. UXT potentiates angiogenesis by attenuating Notch signaling. *Development.* 15 févr 2015;142(4):774-86.

605. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):757-68.

606. Zuo J, Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Molecular and Cellular Biology.* 1 nov 1994;14(11):7557-68.

Rôle du système HSP90/R2TP dans l'assemblage du complexe TSC et la régulation de la voie mTORC1

HSP90 est un chaperon qui stabilise de nombreuses protéines impliquées dans des mécanismes de prolifération cellulaire. De ce fait, elle joue un rôle important dans la tumorigenèse et elle est la cible de nombreux traitements anti-cancéreux. Cependant, HSP90 possède de nombreuses protéines clientes, et son inhibition peut entraîner des effets pléiotropiques non désirés. HSP90 fonctionne avec des co-chaperons qui sont spécifiques de certaines classes de protéines clientes et qui pourraient être ciblés dans des traitements. Il est donc important de comprendre comment fonctionnent ces co-chaperons et quel est l'ensemble de leurs substrats. Le R2TP, encore appelé PAQosome (« Particle for Arrangement of Quaternary structure »), est un co-chaperon de HSP90 qui a la propriété unique d'être impliqué dans l'assemblage de complexes macromoléculaires. Il contient les AAA+ ATPase RUVBL1/2, qui possèdent elles-mêmes une activité chaperon, et les protéines RPAP3 et PIH1D1 qui servent d'adaptateurs et de régulateurs. De manière remarquable, la plupart des substrats connus du R2TP sont impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire. Ceci comprend des régulateurs des PIKKs et notamment mTOR, ainsi que des machineries basales comme les ARN polymérases ou les snoRNP/snRNP.

Le domaine N-terminal de PIH1D1 (PIH1D1-Nter) est connu pour reconnaître certaines protéines clientes possédant un motif DSDD/E où la sérine est phosphorylée. Afin de mieux caractériser le système HSP90/R2TP, j'ai cherché d'autres partenaires de ce domaine par protéomique quantitative après purification par affinité. En plus des substrats connus du R2TP, j'ai identifié les sous-unités du complexe TSC (« Tuberos Sclerosis complex ») : TSC1, TSC2 et TBC1D7. Ceci est très intéressant car ce complexe est un suppresseur de tumeurs. En effet, des mutations dans TSC1 ou TSC2 conduisent à une maladie génétique, la sclérose tubéreuse, où les patients développent des tumeurs bénignes dans de nombreux organes. Le TSC agit comme un régulateur négatif de la voie mTOR, et plus précisément du complexe mTORC1 qui contrôle la croissance cellulaire en réponse aux nutriments, aux facteurs de croissance et aux niveaux d'énergie.

Mon projet de thèse avait deux objectifs : 1) caractériser les liens physiques et fonctionnels entre le système HSP90/R2TP et le complexe TSC ; 2) comprendre le rôle de ce système dans la régulation de la voie mTORC1.

Pour répondre au premier objectif, j'ai d'abord caractérisé l'interaction de HSP90/R2TP avec les sous-unités du complexe TSC au niveau moléculaire. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de protéomique, de phospho-protéomique, des tests d'interactions systématiques par double-hybride ou IP LUMIER. Les résultats obtenus ont permis de mettre au jour plusieurs interactions entre plusieurs composants du R2TP et les sous-unités du TSC et notamment une interaction directe entre PIH1D1 et TSC1. J'ai ensuite réalisé des études fonctionnelles pour montrer que HSP90/R2TP favorise l'assemblage du complexe TSC.

Pour répondre au deuxième objectif, j'ai d'abord évalué l'impact de l'inactivation de PIH1D1 dans des cellules humaines sur la voie mTORC1. Pour cela, j'ai comparé les niveaux d'expression et de phosphorylation des substrats de la voie mTORC1 en l'activant par des traitements à l'insuline dans des cellules « knock out » ou non pour PIH1D1. Dans le cadre d'une collaboration, j'ai aussi étudié mTORC1 et ses substrats dans les cellules intestinales d'un modèle murin, « knock out » inductible pour RPAP3.

A moyen terme, mes résultats permettront de réaliser une caractérisation structurale de l'interaction entre PIH1D1 et TSC1, ce qui permettra de mieux comprendre comment le R2TP reconnaît ses substrats. A plus long terme, une connaissance très approfondie du rôle de HSP90/R2TP sur la régulation de la voie mTORC1 amènera de nouvelles perspectives pour trouver des traitements anti-cancéreux plus spécifiques avec moins d'effets secondaires.

Role of HSP90/R2TP in TSC complex assembly and regulation of mTORC1 pathway

HSP90 is a chaperone that stabilizes many proteins involved in cell proliferation mechanisms. As a result, it plays an important role in tumorigenesis and is the target of many cancer treatments. However, HSP90 has many client proteins, and its inhibition can lead to unwanted pleiotropic effects. HSP90 works with co-chaperones that are specific to certain client protein classes and could be targeted in treatments. It is therefore important to understand how these co-chaperones work and what their substrates are. The R2TP, also called PAQosome (Particle for Arrangement of Quaternary structure), is a co-chaperon of HSP90 which has the unique property of being involved in the assembly of macromolecular complexes. It contains the AAA+ ATPase RUVBL1/2, which have chaperone activity themselves, and the RPAP3 and PIH1D1 proteins which serve as adapters and regulators. Remarkably, most of the known substrates of R2TP are involved in cell proliferation mechanisms. This includes PIKKs regulators, including mTOR, as well as basal machinery such as RNA polymerases or snoRNPs/snRNPs.

The N-terminal domain of PIH1D1 (PIH1D1_NTER) is known to recognize certain client proteins with a DSDD/E motif in which serine is phosphorylated. In order to better characterize the HSP90/R2TP system, I searched for new partners of PIH1D1_NTER by proteomic studies after affinity purification. In addition to the known substrates of R2TP, I have identified the subunits of the TSC complex (Tuberous Sclerosis complex): TSC1, TSC2 and TBC1D7. This is very interesting because this complex is a tumor suppressor. Indeed, mutations in TSC1 or TSC2 lead to a genetic disease, tuberous sclerosis, where patients develop benign tumors in many organs. TSC acts as a negative regulator of the mTOR pathway, specifically the mTORC1 complex that controls cell growth in response to nutrients, growth factors and energy levels.

My thesis project has two objectives: 1) to characterize the physical and functional links between HSP90/R2TP system and TSC complex; 2) to understand the role of this system in the regulation of mTORC1 pathway.

To answer to the first objective, I have first characterized the interaction between HSP90/R2TP and TSC subunits at the molecular level. For this, I have carried out proteomics, phospho-proteomics experiments, systematic interaction tests by double-hybrid or IP LUMIER. The results obtained allow to identify several interactions between component of R2TP and TSC subunits and especially a direct interaction between PIH1D1 and TSC1. Then, I have performed functional studies to show that HSP90/R2TP system favors TSC complex assembly.

To answer the second objective, I wanted to assess the impact of inactivation of PIH1D1 on mTORC1 pathway. For this, I have studied substrates of this pathway after activation through insulin treatment in human cells knock out for PIH1D1 compared to parental cells. In a collaborative work, I have studied mTORC1 and its substrates in intestine cells from a murin model with inducible knock out of RPAP3.

In the medium term, a structural study of the interaction between PIH1D1 and TSC1 will be done, which will allow to better understand how R2TP recognizes its substrates. In the long term, understanding the role of HSP90/R2TP in regulating the mTORC1 pathway would bring new perspectives to design more specific anti-cancer treatments with fewer side effects.