



HAL
open science

ETUDE DE L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE EJC (EXON JUNCTION COMPLEX)

Isabelle Barbosa

► **To cite this version:**

Isabelle Barbosa. ETUDE DE L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE EJC (EXON JUNCTION COMPLEX). Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. hal-01992567

HAL Id: hal-01992567

<https://ephe.hal.science/hal-01992567>

Submitted on 24 Jan 2019

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

Isabelle BARBOSA

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

ETUDE DE L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE EJC (EXON JUNCTION COMPLEX)

Soutenu le 17 décembre 2018 devant le jury suivant :

Sylvie DEMIGNOT – Président
Hervé LE HIR – Tuteur scientifique
Thi-My-Anh NEILDEZ – Tuteur pédagogique
Dominique WEIL – Rapporteur
Magali BLAUD – Examineur

Mémoire préparé sous la direction du : Dr Hervé LE HIR
IBENS – UMR 8197
Section Génomique fonctionnelle
46, rue d'Ulm, 75005 PARIS

Et du : Dr Thi-My-Anh NEILDEZ
GENETHON-UMR 951
Approches génétiques intégrées et nouvelles thérapies pour les maladies rares
(INTEGRARE)
1 bis, rue de l'internationale, 91000 EVRY

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

ETUDE DE L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE EJC (EXON JUNCTION COMPLEX)

Isabelle BARBOSA

17 décembre 2018

RÉSUMÉ

Chez les eucaryotes, la maturation et les fonctions des ARN messagers (EJC) sont dictées par de nombreuses protéines se liant à l'ARN. Le complexe EJC (*Exon Junction Complex*), est un complexe multiprotéique déposé sur des ARNm, produits de l'épissage. Ce complexe est organisé autour d'un cœur tétramérique, constitué des facteurs eIF4A3 qui assurent la liaison à l'ARN et des protéines MLN51, Magoh et Y14. Le cœur de l'EJC constitue une plate-forme pour de nombreux facteurs périphériques qui influencent l'épissage des ARN pré-messagers, participent à la localisation, la traduction et la stabilité des ARNm. Si l'EJC joue un rôle central dans la vie des ARNm son mode d'assemblage reste mal compris. Notre laboratoire a identifié le facteur d'épissage CWC22 et montré qu'il est essentiel pour escorter eIF4A3 dans le spliceosome et pourrait être impliqué dans la régulation de l'assemblage de l'EJC. Récemment, nous avons identifié la protéine CWC27 comme partenaire potentiel de CWC22 et eIF4A3. L'objectif de mon projet fut de caractériser par des approches *in vitro* et *in vivo* le complexe formé par ces trois protéines : CWC27, CWC22 et eIF4A3. La mise au point de conditions d'immunoprécipitation de la protéine CWC27 à partir de cellules humaines en culture puis l'analyse des éluats par spectrométrie de masse et par western blot m'ont permis de montrer que les protéines CWC27 et CWC22 forment un dimère dans la cellule. Dans un second temps, l'expression de ces protéines recombinantes m'a permis de démontrer que l'interaction entre ces deux partenaires était directe. Le dimère offrirait alors un site de liaison stable pour la fixation de la protéine eIF4A3.

L'ensemble de ces résultats suggère que le complexe formé par les protéines CWC27 et CWC22 pourrait constituer un pré-complexe-EJC (pré-EJC) impliqué dans le recrutement de la protéine eIF4A3 par la machinerie d'épissage pour l'assemblage des EJC. L'impact de ces travaux est d'autant plus important qu'ils s'inscrivent dans un contexte plus global, la compréhension de maladies génétiques orphelines associées aux mutations des protéines CWC27 et eIF4A3.

MOTS CLES : EJC, eIF4A3, épissage, ARNm, CWC22, CWC27, spliceosome.

Tables des matières

I. INTRODUCTION	1
1. COMPOSITION ET STRUCTURE DE L'EJC	1
1.1 LE CŒUR DE L'EJC	2
1.2 FACTEURS PERIPHERIQUES	3
2. FONCTIONS DE L'EJC	5
2.1 LES MULTIPLES FONCTIONS DE L'EJC	5
2.2 LES MALADIES GENETIQUES LIEES A L'EJC	7
3. ASSEMBLAGE DE L'EJC PAR LE SPLICEOSOME	8
3.1 ASSEMBLAGE DYNAMIQUE DE LA MACHINERIE D'EPISSAGE	8
3.2 CWC22, UN FACTEUR CENTRAL POUR L'ASSEMBLAGE DE L'EJC	10
4. RESULTATS PRELIMINAIRES : IDENTIFICATION DE PARTENAIRES DE CWC22 ET EIF4A3	12
4.1 LES PROTEINES SR (SERIN RICH)	13
4.2 LA PROTEINE CWC27	13
5. OBJECTIF DU PROJET DE RECHERCHE	14
II. MATERIEL ET METHODES	15
1. BIOLOGIE MOLECULAIRE	15
1.1 CLONAGE DE PLASMIDES BACTERIENS	15
1.2 LIGATION	17
1.3 TRANSFORMATION DE BACTERIES COMPETENTES MH1 : CLONAGE	17
1.4 MINI ET MIDI PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE	17
1.5 SEQUENÇAGE	17
2. BIOCHIMIE	18
2.1 MIGRATION DES GELS	18
2.2 METHODES DE REVELATION DES PROTEINES	18
2.3 PURIFICATION DE PROTEINES	22
2.4 PURIFICATION SUR RESINE DE NICKEL	24
2.5 PURIFICATION SUR RESINE DE CALMODULINE	25
2.6 INTERACTION IN VITRO	27
2.7 IMMUNOPRECIPITATION DE PROTEINES A PARTIR D'EXTRAITS CELLULAIRES	30

3. BIOLOGIE CELLULAIRE	33
3.1 CELLULES HUMAINES HELA ET HEK293	33
4. FLUORESCENCE	35
4.1 IMMUNOFLUORESCENCE	35
III. RESULTATS ET DISCUSSION	38
1. PURIFICATION D'UN COMPLEXE NATIF <i>IN VIVO</i>	38
1.1 MISE EN PLACE DES OUTILS POUR L'IMMUNOPRECIPITATION	38
1.2 LYSE CELLULAIRE	38
1.3 LYSE CELLULAIRE AVEC SONICATION	39
1.4 EFFET DU TRAITEMENT RNASE SUR LA LYSE CELLULAIRE	40
2. CARACTERISATION DES PARTENAIRES DE CWC27	41
2.1 MISE AU POINT DE L'IMMUNOPRECIPITATION	41
3. LOCALISATION DE CWC27	45
4. INTERACTION <i>IN VITRO</i>	45
4.1 RECONSTITUTION DU DIMERE CWC22/CWC27	46
4.2 INTERACTION SPECIFIQUE D'EIF4A3 AVEC LE DIMERE CWC27/CWC22	48
4.3 CONTROLES AVEC LA PROTEINE CWC22-S ET EIF4A3	48
IV. CONCLUSION	50
1. CWC22 ET CWC27 EXISTENT SOUS FORME D'UN HETEROMERE	50
2. RECONSTITUTION DU COMPLEXE CWC22/CWC27/EIF4A3	51
3. UN NOUVEAU MODELE D'ASSEMBLAGE DE L'EJC	53
V. PERSPECTIVES	54

Figures

FIGURE 1 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE L'EJC ET D'EIF4A3	2
FIGURE 2 : SCHEMA DE L'EVOLUTION STRUCTURELLE DE L'EJC AU COURS DU VOYAGE DE L'ARNM.	4
FIGURE 3 : REGULATION DE L'EPISSAGE PAR L'EJC.....	5
FIGURE 4 : ROLE DE L'EJC DANS LE DECLENCHEMENT DU NMD.....	7
FIGURE 5 : LA DYNAMIQUE DE LA MACHINERIE D'EPISSAGE.	9
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE CWC22.....	10
FIGURE 7 : STRUCTURE DU COMPLEXE CWC22/EIF4A3 HUMAIN.....	11
FIGURE 8 : RESULTATS DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE DES PROTEINES ASSOCIEES A EIF4A3 ET CWC22.....	13
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE CWC27.	13
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE D'ETAPES DE L'ASSEMBLAGE DE L'EJC.	14
FIGURE 11 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES LYSATS CELLULAIRES OBTENUS A L'AIDE DES TAMPONS HKM ET RIPA.....	39
FIGURE 12 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES LYSATS APRES SONICATION.	40
FIGURE 13 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DES LYSATS APRES TRAITEMENT RNASE.....	40
FIGURE 14 : PRINCIPE DE L'IMMUNOPRECIPITATION (IP).....	41
FIGURE 15 : WESTERN BLOT DES ELUATS OBTENUS APRES IMMUNOPRECIPITATION DE FLAG-CWC27.	41
FIGURE 16 : SCHEMA REPRESENTATIF DE L'IP ET RESULTAT DU WESTERN BLOT DE L'IP.....	42
FIGURE 17 : SCHEMA SIMPLIFIE DE L'ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS).....	43
FIGURE 18 : RESULTATS DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE SOUS FORME DE GRAPHIQUES VOLCANO PLOT.	44
FIGURE 19 : LOCALISATION CELLULAIRE DE CWC27 FUSIONNEE AVEC LA GFP.	45
FIGURE 20 : METHODOLOGIE DE LA CO-EXPRESSION DE CWC22/CWC27.	46
FIGURE 21 : CO-EXPRESSION BACTERIENNE DE L'HETERODIMERE CWC22/CWC27.	47
FIGURE 22 : PRINCIPE DES INTERACTIONS IN VITRO ET RESULTATS DU DIMERE AVEC EIF4A3.....	48
FIGURE 23 : RESULTATS DES INTERACTIONS IN VITRO APRES LAVAGES A 150MM ET 300MM NaCl.	49
FIGURE 24 : MODELE POSSIBLE DE L'ASSEMBLAGE DE L'EJC.	53

Liste des abréviations utilisées

aa : Acide Aminé

ARN : *Acide Ribonucléique*

ARNm : *ARN messagers*

CBP : *Calmodulin Binding Peptide*

CWC22 : *Complexed With Cef1 22*

eIF4A3 : *eukaryotic Initiation Factors 4A3*

EJC : *Exon Junction Complex*

kb : kilopaires de bases

IP : Immunoprécipitation

LC-MS/MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

Magoh : *Mago Nashi human homologue*

MLN51 : *Metastatic Lymph Node 51*

NMD : *Non-sense Mediated mRNA Decay*

RBM8A : *RNA binding motif protein 8A*

RBP: *RNA Binding Protein*

SELOR : *Speckle Localizer and RNA-binding module*

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Chez les métazoaires de nombreux mécanismes interviennent pour réguler de manière fine l'expression des gènes selon la spécificité cellulaire et son environnement. Une part importante de ces régulations prend place notamment au niveau post-transcriptionnel. En effet, de multiples signaux peuvent influencer l'avenir des ARN messagers (ARNm) et ainsi l'expression des protéines correspondantes. Il s'avère que les ARNm naissants sont couverts par une myriade de protéines qui dictent leur devenir (Singh et al., 2015). L'identité de ces protéines dites RBP (RNA Binding Protein) dépend entre autres de la séquence primaire de l'ARN ainsi que de sa maturation. Afin de décrypter les régulations post-transcriptionnelles, il est essentiel de décoder le mode d'assemblage complexe des particules RBP.

Parmi ces RBP, le laboratoire s'intéresse en particulier au complexe EJC (*Exon Junction Complex*) qui illustre clairement l'importance et la complexité de l'assemblage de ces particules (Le Hir et al., 2016). L'EJC a été découvert en 2000 (Le Hir, 2000). C'est un complexe multi-protéique déposé 25 nucléotides en amont des jonctions d'épissage exon-exon des ARNm après élimination des introns par la machinerie d'épissage, le spliceosome. Une fois assemblés dans le noyau, les EJC liés aux ARNm, sont transférés dans le cytoplasme où ils seront désassemblés par les ribosomes au cours de la traduction des ARNm. Durant ce voyage, l'EJC sert de plateforme moléculaire et recrute de nombreux facteurs dits périphériques qui confèrent à l'EJC ses différentes fonctions (Le Hir et al., 2016).

Dans l'introduction présentée ci-dessous, je présenterai les composants et la structure de l'EJC, les fonctions de ce complexe ainsi que son mode d'assemblage par la machinerie d'épissage.

1. COMPOSITION ET STRUCTURE DE L'EJC

L'EJC se compose d'une quinzaine de protéines qui peuvent être divisées en deux groupes. Le premier est constitué de quatre protéines constantes formant le cœur de l'EJC (**Figure 1A**). Le second correspond à l'ensemble des protéines appelées facteurs périphériques qui sont recrutés par le cœur de l'EJC.

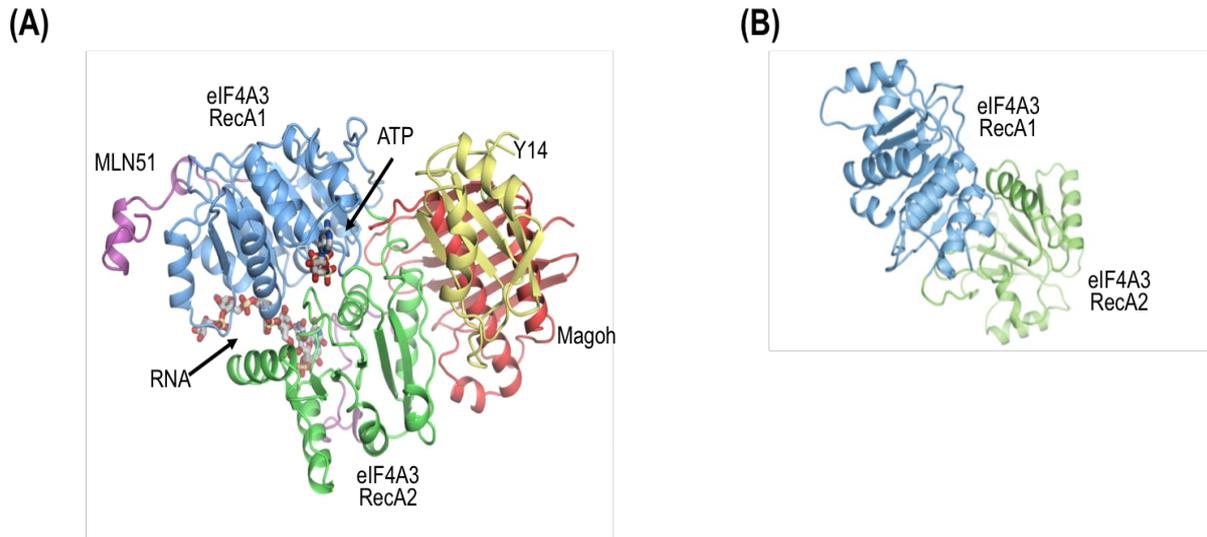


Figure 1: Structure cristallographique de l'EJC et d'eIF4A3

(A) Structure de l'EJC en présence d'ATP et d'ARN, avec les domaines RecA1 et RecA2 de eIF4A3 colorés en bleu et vert, respectivement. MLN51 est représenté en violet, Y14 en jaune et Magoh en rouge (Andersen et al., 2006). (B) Structure d'eIF4A3 présentant ses deux domaines RecA (N-terminal, en bleu et C-terminal, en vert) caractéristiques des ARN hélicases à boîte DEAD (Andersen et al., 2006).

1.1 Le cœur de l'EJC

Structurellement, l'EJC est organisé autour d'un cœur tétramérique composé des quatre protéines suivantes : eIF4A3 (ekaryotic initiation factor 4A3), Magoh (Mago Nashi human homologue), Y14 (ou RBM8A pour RNA binding motif protein 8A) et MLN51 (Metastatic Lymph Node 51 ou CASC3, Cancer Susceptibility Candidate gene 3).

La protéine eIF4A3 (ou DDX48) est une protéine de 411 acides aminés (aa) appartenant à la famille des ARN hélicases de la superfamille 2 (SF2), caractérisées par le motif conservé Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD). Elle contient deux domaines de type « RecA-like » en tandem, nommés RecA1 et RecA2 (**Figure 1B**). La protéine eIF4A3 présente 65% homologie de séquence avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4A1. Cependant contrairement à eIF4A1, eIF4A3 est une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme mais reste majoritairement nucléaire.

Magoh (146 aa) et Y14 (173 aa) sont deux petites protéines nucléaires qui comme eIF4A3 peuvent faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Magoh et Y14 forment un hétérodimère très stable et dont la fonction reste méconnue sous leur forme monomérique. L'interaction de Magoh avec le domaine de liaison à l'ARN (RNA

binding motif protein) de la protéine Y14 empêche l'hétérodimère de se lier directement à l'ARN (Lau et al., 2003).

MLN51 est une protéine principalement cytoplasmique de 703 résidus qui ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines (Degot et al., 2002). Le domaine le plus conservé de MLN51, appelé SELOR (Speckle Localizer and RNA-binding module) est nécessaire et suffisant pour la présence de MLN51 dans le noyau et à la formation du cœur de l'EJC (Ballut et al., 2005; Degot et al., 2004).

Ensemble ces protéines assurent la liaison stable de l'EJC sur l'ARNm indépendamment de sa séquence. En effet, en présence d'une molécule d'ATP l'hélicase eIF4A3 adopte une conformation fermée sur l'ARN (**Figure 1A**) contrairement à la protéine seule en absence d'ATP et d'ARN (**Figure 1B**). Ainsi eIF4A3 couvre 6 nucléotides et interagit avec le squelette ribose-phosphate sans spécificité de séquence. En interagissant avec les 2 domaines RecA d'eIF4A3, le dimère Magoh/Y14 maintient l'hélicase dans une conformation fermée et assure ainsi la liaison stable du complexe sur l'ARN. MLN51 entoure eIF4A3 et contribue à la liaison à l'ARN.

1.2 Facteurs périphériques

Les protéines du cœur de l'EJC qui sont déposées sur les ARNm par la machinerie d'épissage (voir le paragraphe 3.1), forment une plate-forme d'ancrage pour les protéines dites périphériques de l'EJC (Le Hir et al., 2016; Tange et al., 2004). Le cœur de l'EJC accompagne les ARNm lors de leur transport du noyau vers le cytoplasme. Le complexe interagit alors successivement avec des facteurs nucléaires puis des facteurs cytoplasmiques qui s'associent de manière dynamique et temporaire avec le cœur. Parmi ces facteurs nous retrouvons des facteurs de régulation de l'épissage (RNPS1, Pinin, Acinus et SAP18), des facteurs de transport d'ARNm (UAP56, REF/Aly, et TAP/p15), des facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm (Upf1, Upf2 et Upf3), un facteur impliqué dans la traduction (SKAR) ainsi que des facteurs de fonction restant encore inconnue (EJC binding proteins) (**Figure 2**).

Les EJC associés aux ARNm sont finalement désassemblés lors du premier événement de traduction dans le cytoplasme (Gehring et al., 2009) et les protéines nucléaires de l'EJC ré-adressées au noyau.

L'EJC marque donc les ARNm épissés depuis leur synthèse dans le noyau jusqu'au moment où ils serviront de matrice pour la traduction.

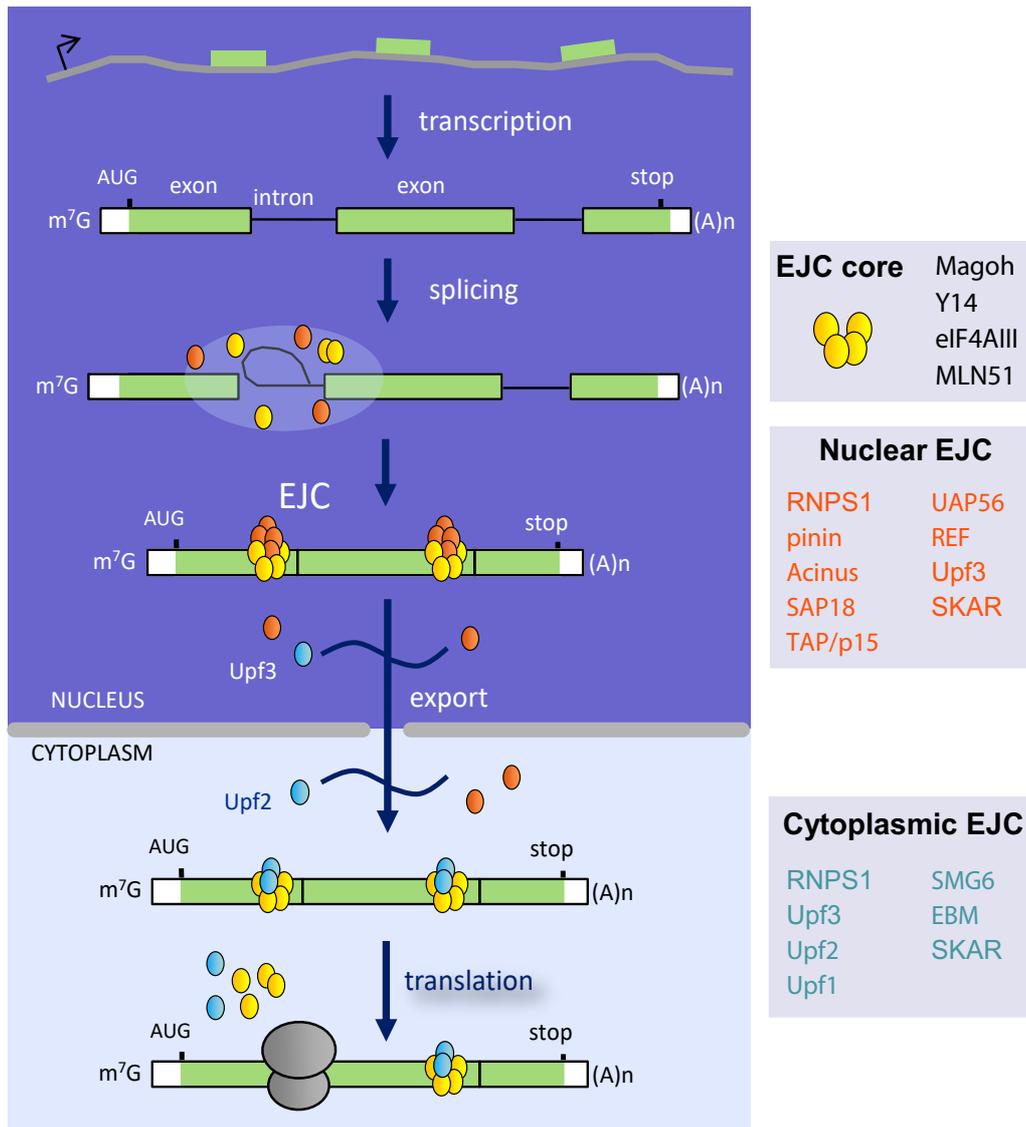
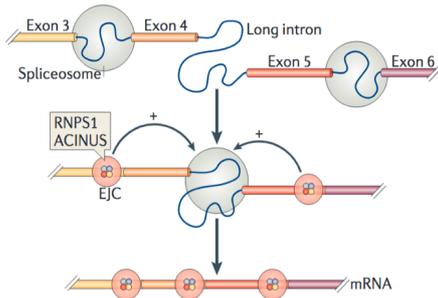


Figure 2 : Schéma de l'évolution structurale de l'EJC au cours du voyage de l'ARNm.

Les protéines du cœur de l'EJC (en jaune), respectivement eIF4A3, MLN51 et le dimère Magoh/Y14 (en jaune) sont déposées sur le transcrite par la machinerie d'épissage. Ce cœur sert à la liaison à plusieurs facteurs protéiques périphériques aussi bien dans le noyau (en orange), que dans le cytoplasme (en bleu clair). L'EJC est *in fine* désassemblé lors du premier cycle de traduction consécutivement au passage du premier ribosome.

(A)



(B)

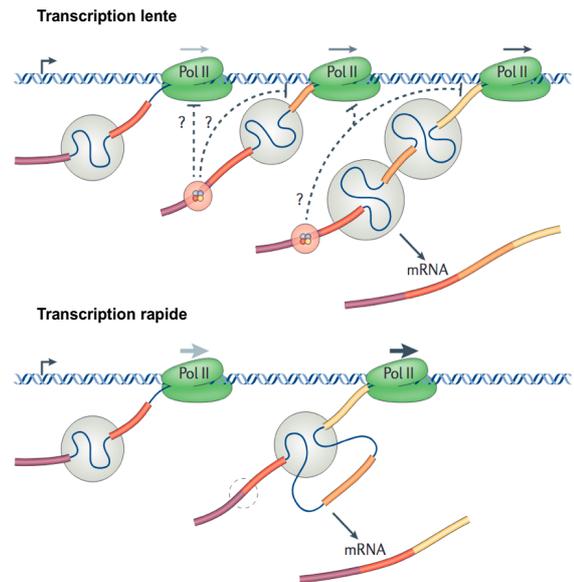


Figure 3 : Régulation de l'épissage par l'EJC

(A) Mécanisme direct de la régulation de l'épissage par l'EJC. (B) Transcription lente (en haut): mécanisme indirect de la régulation de l'épissage par l'EJC, implique que les EJC déposés pendant la transcription peut ralentir (par un mécanisme inconnu, indiqué par "?") le taux de l'allongement de l'ARN polymérase II (Pol II), ce qui laisse plus de temps pour un épissage correct. Transcription rapide (en bas) : en l'absence d'EJC, l'augmentation de la vitesse de l'ARN polymérase II causera plusieurs sauts d'exon. (Le Hir et al., 2016)

2. FONCTIONS DE L'EJC

2.1 Les multiples fonctions de l'EJC

En accompagnant les ARNm du noyau jusqu'au cytoplasme où ils seront traduits, les protéines de l'EJC participent à plusieurs processus post-transcriptionnels. L'EJC influence l'épissage des ARN pré-messagers puis participe au transport, à la localisation cellulaire, à la traduction et la stabilité des ARNm.

2.1.1 L'épissage des ARN pré-messagers

Dans le noyau, l'EJC est associé à plusieurs facteurs impliqués dans la reconnaissance des introns et dans la régulation de l'épissage alternatif : RNPS1, ACINUS, SAP18 et PININ. Chez les métazoaires, la présence de plusieurs introns dans un même ARN pré-messager et leur épissage alternatif permet de produire plusieurs ARNm à partir d'un seul précurseur. Comme nous le verrons plus loin, l'EJC est déposé sur les jonctions exoniques par la machinerie d'épissage. Cependant, une fois déposé, un EJC peut grâce à ses facteurs d'épissage réguler l'épissage des introns directement voisins (**Figure 3A**; (Malone et al., 2014; Wang and Murigneux, 2014)). L'EJC sert ainsi dans ce cas de régulateur direct d'épissage. D'autre part, le laboratoire a très récemment montré que les facteurs d'épissage liés à l'EJC peuvent varier et ainsi réguler de manière différentielle l'épissage d'un même ARN pré-messagers (**Figure 3B** ; (Wang et al., 2018)).

2.1.2 Le transport des ARNm

Les EJC contiennent plusieurs protéines périphériques impliquées dans le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme.

Ainsi, les facteurs REF/Aly (THOC4) et UAP56 (Le Hir, 2000; Luo et al., 2001; Zhou et al., 2000) interagissent spécifiquement avec le récepteur d'export nucléaire NXF1/NXT1 (ou TAP/p15 ; (Le Hir, 2001) dont l'interaction ultérieure avec les autres composants protéiques du pore nucléaire permettra l'export régulé du transcrit. Dans ce contexte, l'EJC est donc un adaptateur important permettant au dimère NXF1/NXT1 de se lier spécifiquement aux ARNm pour promouvoir leurs transports.

2.1.3 La localisation cellulaire des ARNm

Les études sur la localisation de l'ARNm oskar dans l'embryon de drosophile ont montré que l'EJC sert également à la localisation d'ARNm ciblés dans certaines cellules. En effet, les quatre protéines du cœur de l'EJC : eIF4A3, Barentz (homologue de MLN51), Mago Nashi (homologue de Magoh) et Tsunagi (homologue de Y14) sont toutes essentielles pour le transport de l'ARNm oskar au pôle postérieur de l'ovocyte (van Eeden et al., 2001; Hachet and Ephrussi, 2001; Mohr et al., 2001). Or, la traduction locale de cet ARNm est nécessaire pour la formation de la lignée germinale et de l'abdomen chez l'embryon en développement (Kugler and Lasko, 2009). Jusqu'à présent, aucun autre mécanisme similaire de localisation subcellulaire d'ARNm dépendant des protéines de l'EJC n'a été décrit. Cependant, la localisation ciblée des protéines eIF4A3, Magoh, Y14 et BTZ sur les dendrites neuronales suggère que ces protéines pourraient également fonctionner dans d'autres types de cellules pour lesquelles une traduction localisée des transcrits est nécessaire (Giorgi et al., 2007; Glanzer et al., 2005; Macchi et al., 2003; Monshausen et al., 2004).

2.1.4 La traduction

L'EJC, par sa fixation, marque les ARNm avant qu'ils ne soient traduits en protéines et modifie positivement leur efficacité de traduction (Nott et al., 2004). Au moins deux facteurs de l'EJC sont capables de contribuer à cette activation. L'un est la protéine périphérique SKAR (Ma et al., 2008) qui n'est probablement pas présente sur tous les EJC et l'autre est la protéine MLN51, facteur du cœur de l'EJC (Chazal et al., 2013) qui s'associe directement avec le complexe d'initiation de la traduction par son interaction avec la protéine eIF3 (Chazal et al., 2013).

2.1.5 Le Nonsense-mediated mRNA decay ou NMD

La fonction la mieux documentée de l'EJC, car elle est à l'origine de sa découverte, concerne son rôle dans le processus de NMD. Le NMD est un processus de contrôle qui permet d'identifier et de dégrader les ARNm défectueux porteurs d'un codon de terminaison de la traduction prématurée (PTC ; (Lykke-Andersen and Jensen, 2015)). Ces ARNm sont obtenus à la suite d'erreurs émises lors des étapes de transcription ou de maturation des ARN pré-messagers ou par la présence de

mutations génomiques. En dégradant ces transcrits, le NMD protège la cellule de la synthèse de protéines défectueuses ou tronquées et potentiellement délétères (**Figure 4**).

Dans ce processus, l'EJC a un rôle dans l'identification des PTC. En effet, lorsque le ribosome s'arrête à un PTC, la présence du complexe directement en aval associe aux facteurs du NMD, les protéines UPF2 et UPF3, ce qui conduit au recrutement du facteur UPF1 essentiel pour enclencher le processus de dégradation des ARNm (**Figure 4** ; (He and Jacobson, 2015)). D'autre part, via le NMD, l'EJC contribue également à la régulation de l'expression d'ARNm "normaux" qui portent malgré tout des signaux de déclenchement du NMD mais de natures différentes telle que la présence d'introns dans les régions 3' non-traduites (Giorgi et al., 2007).

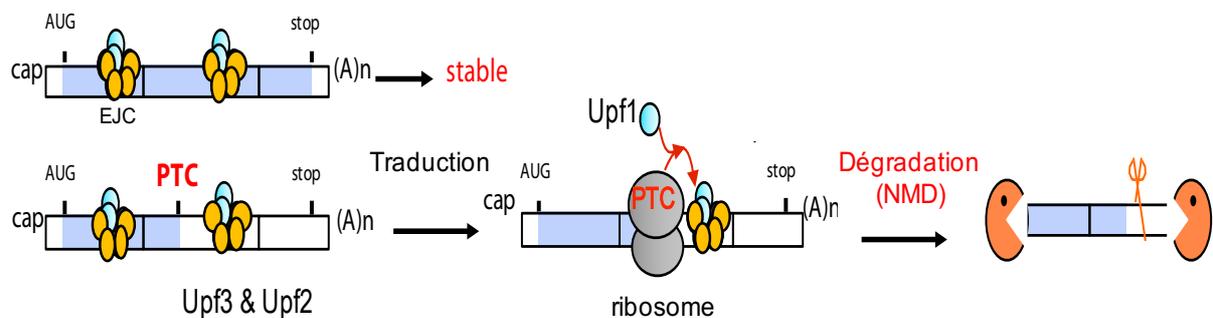


Figure 4 : Rôle de l'EJC dans le déclenchement du NMD.

Le ribosome (en gris) bloqué sur le PTC de l'ARNm recrute la protéine Upf1 qui interagit avec les protéines Upf2-Upf3, portées par l'EJC présent en aval du PTC. L'ARNm est alors dégradé par le système NMD.

2.2 Les maladies génétiques liées à l'EJC

L'importance physiologique de l'EJC est étayée par de récentes observations montrant que des mutations génétiques sont responsables de maladies orphelines humaines et que des anomalies d'expression de plusieurs protéines sont à l'origine de défauts du développement chez divers organismes.

Ainsi la réduction de l'expression des protéines Magoh, Y14 ou eIF4A3 entraîne des défauts de développement majeurs tels que la spécification de l'axe du corps embryonnaire chez la drosophile, une neurogenèse réduite suite à une perturbation du cycle cellulaire des cellules souches neurales (NSCs) ou encore une microcéphalie chez la souris (Mao et al., 2016).

L'EJC a également été lié à différentes maladies humaines, tel que, le syndrome TAR (Thrombocytopenia with Absent Radii) ayant pour cause une mutation du gène *RBM8a* codant la protéine Y14 (Albers et al., 2012). Ce syndrome se caractérise par des défauts de développement du cerveau, associé à une thrombopénie et une absence de radius. Cette maladie génétique très rare au niveau du sang et d'une malformation congénitale est déclenchée par une carence en protéine Y14. A cet exemple, s'ajoute le cas du syndrome de Richieri-Costa-Pereira, caractérisé par des anomalies crâniofaciales et des défauts développementaux des membres (Favaro et al., 2014). Ce syndrome lui est associé à une expansion de 18-20 nt de répétitions non codantes dans la région 5' non traduite (UTR) du gène *eIF4A3*. Ce phénotype a été reproduit en réalisant un knockdown d'*eIF4A3* chez le poisson zèbre, confirmant le rôle d'*eIF4A3* dans les développements crâniofaciaux.

3. Assemblage de l'EJC par le spliceosome

L'EJC n'est pas un complexe préformé qui s'associe par simple interaction avec les ARNm. L'assemblage de l'EJC est intimement couplé à la réaction d'épissage. Dans cette partie, après une description brève de la réaction d'épissage, je souhaite attirer l'attention du lecteur sur l'état de nos connaissances actuelles concernant le dépôt de l'EJC par la machinerie d'épissage, le spliceosome.

3.1 Assemblage dynamique de la machinerie d'épissage

L'épissage est un processus dynamique d'une grande complexité qui fait intervenir plusieurs centaines de protéines (Wahl et al., 2009). Au cours de la transcription, l'ARN pré-messager qui est composé de successions d'introns et d'exons, subit un épissage. L'intron est une portion de gène, non codant le plus souvent, contrairement aux exons qui sont des portions codantes. Au cours de la transcription, l'ARN qui est composé de successions d'introns et d'exons, subit un épissage. L'épissage est l'ablation des introns de l'ARN pour donner un ARN mature.

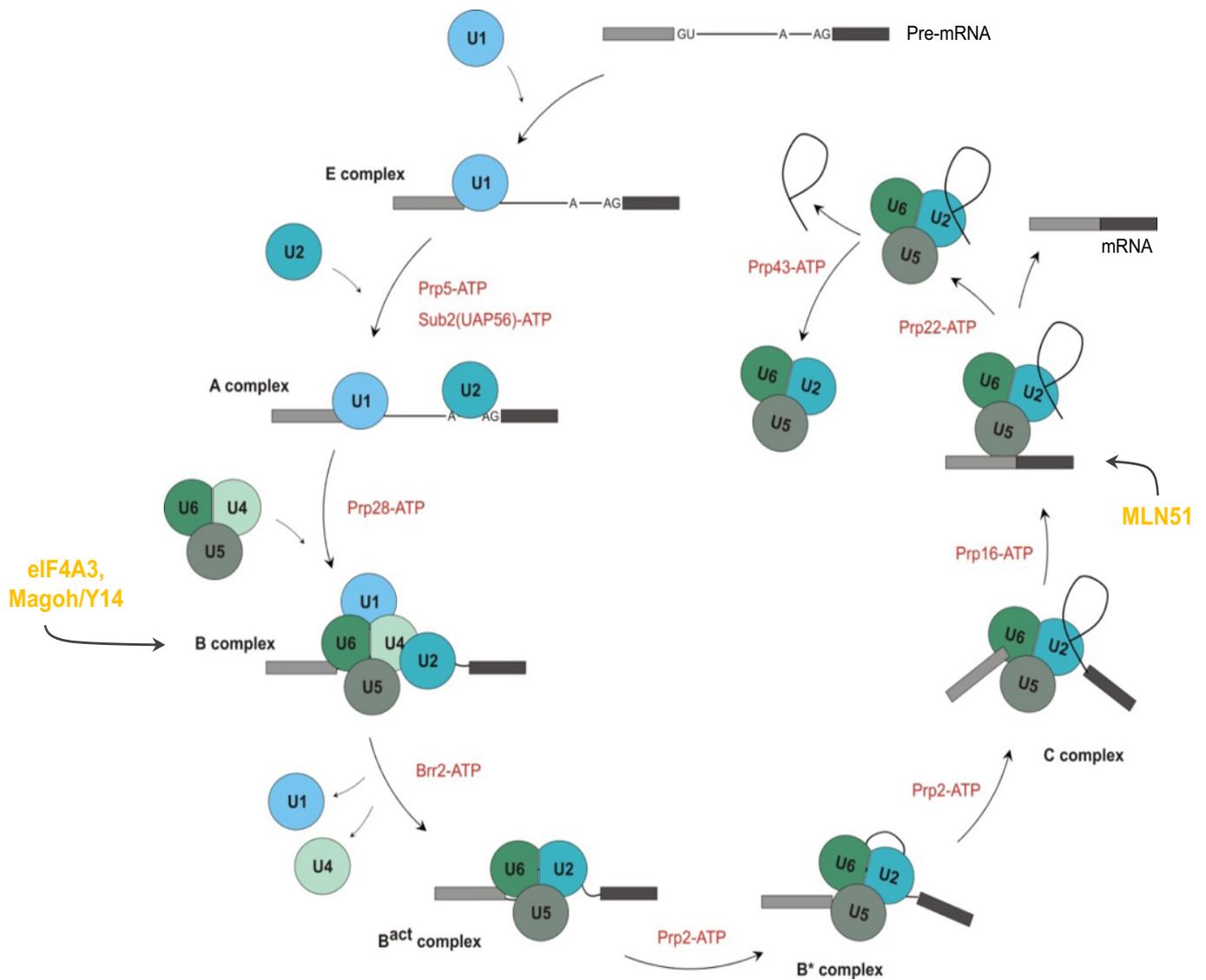


Figure 5 : La dynamique de la machinerie d'épissage.

Le spliceosome est une machinerie dynamique qui passe par la mise en place de cinq complexes successifs (E, A, B, B* et C). Les différents snRNP requis et leurs interventions dans le cycle d'épissage des transcrits sont indiqués à chaque étape (Will and Luhrmann, 2011).

Les introns sont définis par plusieurs séquences situées aux jonctions exon-intron, les sites 5' et 3' d'épissage et une séquence appelée « le point de branchement » située en amont du site 3' d'épissage. L'excision de chaque intron nécessite l'assemblage d'un complexe multi-protéique, le spliceosome, dont l'organisation est temporellement et spatialement définie. La formation du spliceosome est dynamique et marquée par la présence de cinq complexes successifs (E, A, B, B^{act} et C). Chaque complexe est caractérisé par la présence de différentes snRNPs (petites ribonucléoprotéines nucléaires de l'anglais, *small nuclear ribonucleoprotein*) et de leurs cofacteurs (**Figure 5**). Cinq classes de snRNP (U1, U2, U4, U5 et U6) participent à l'épissage des ARNm et constituent ce qu'on appelle le spliceosome. Les rôles fonctionnels des différentes snRNP sont les suivants : U1 sert à la reconnaissance du site d'épissage 5' , U2 reconnaît la séquence du point de branchement, U4 sert de chaperon à U6, qui vient se fixer au niveau des jonctions intron / exon, U5 maintient les deux exons à proximité immédiate l'un de l'autre, pour en permettre la suture et finalement, U6 porte probablement l'activité catalytique qui permet les deux étapes catalytiques (coupure de la jonction amont, suture avec la jonction aval). L'excision de chaque intron nécessite l'assemblage d'un spliceosome actif qui nécessite un processus dynamique marqué par la formation de cinq complexes successifs (E, A, B, B^{act} et C). Chaque complexe est défini par la présence de différents snRNPs (petites ribonucléoprotéines nucléaires de l'anglais, *small nuclear ribonucleoprotein*) et de leurs cofacteurs (**Figure 5**).

Le processus d'épissage est organisé dans le temps et l'espace. Il débute par la formation du **complexe E** avec l'engagement de l'ARN pré-messager et par la reconnaissance des séquences consensus d'épissage par snRNP U1.

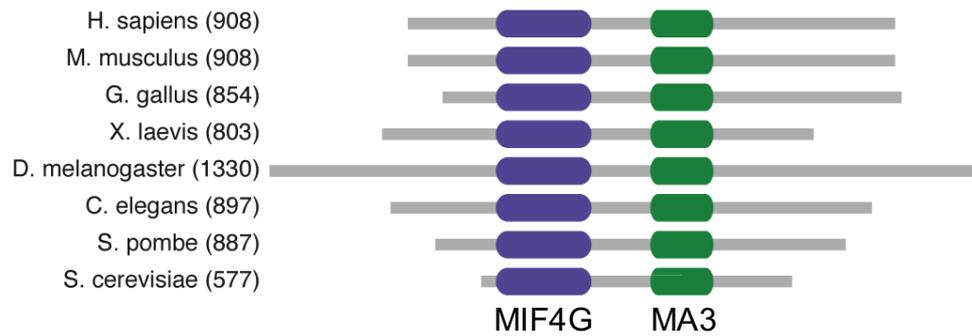


Figure 6: Représentation schématique de CWC22. Les domaines MIF4G et MA3 conservés dans différentes espèces. Chiffres en () : taille en acides aminés de chaque protéine. (Barbosa et al., 2012).

S'en suit le recrutement de snRNP U2 qui se lie au point de branchement pour former le **complexe A**. L'arrivée d'un complexe tri-snRNP (U4/U6 et U5) entraîne alors la transition du complexe A vers le **complexe B inactif** contenant les cinq snRNPs (U1, U2, U4, U5 et U6). Ceci engendre un réarrangement moléculaire qui entraîne le départ conjoint des snRNP U1 et U4 pour former le **complexe B activé ou B^{act}** puis le **complexe C**. De nombreux facteurs auxiliaires d'épissage contribuent à la reconnaissance des sites d'épissage par les snRNPs et à l'assemblage dynamique des différents partenaires du spliceosome. Parmi ces facteurs on peut citer les protéines de la famille SR, des protéines modulaires caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN à leur extrémité N-terminale et d'un domaine riche en résidus arginine-sérine (RS) permettant des interactions protéine-protéine à leur extrémité C-terminale (voir ci-dessous, 4.1).

Au cours du cycle dynamique d'épissage, les protéines Magoh, Y14 et eIF4A3 sont localisées dès la formation du **complexe B^{act}** et restent stablement associées dans le **complexe C**. En effet, eIF4A3 et le dimère Magoh/Y14 sont recrutés par le spliceosome au cours de la formation du complexe B et C (Bessonov et al., 2008; Deckert et al., 2006) avant l'excision de l'intron et ce qui initie l'assemblage de l'EJC sur un ARN pré-messager. Tandis que MLN51 est recrutée en fin de cycle d'épissage par le spliceosome (Gehring et al., 2009).

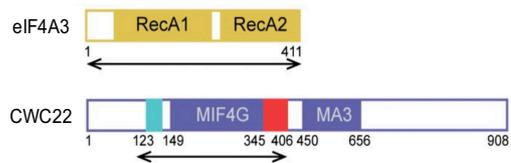
3.2 CWC22, un facteur central pour l'assemblage de l'EJC

3.2.1 Identification de CWC22

Plus récemment, nos travaux en collaboration avec l'équipe de Marco Blanchette (Stowers Institute, Kansas City, Etats-Unis) ont permis de franchir une première étape importante dans notre compréhension de l'assemblage de l'EJC en identifiant le facteur d'épissage CWC22 (*Complexed With Cef1 22*) comme acteur important pour le recrutement d'eIF4A3 (Barbosa et al., 2012).

La protéine CWC22 a été originellement découverte chez la levure (Ohi and Gould, 2002). Cette protéine conservée chez l'ensemble des eucaryotes est composée de deux domaines : MIF4G (*Middle domain of eIF4G*) et MA3 conservés chez différentes espèces. (**Figure 6**).

(A)



(B)

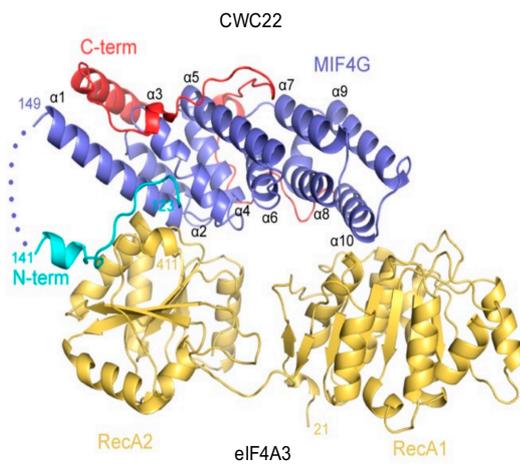


Figure 7 : Structure du complexe CWC22/eIF4A3 humain.

(A) Les domaines RecA d'eIF4A3 sont en jaunes. Dans le cas de CWC22, le domaine MIF4G est en bleu et les extensions N- et C-terminales sont respectivement en cyan et en rouge. Les flèches mettent en évidence les régions protéiques utilisées pour la cristallisation du complexe. (B) Structure cristallographique du complexe CWC22 avec eIF4A3, molécules colorées comme dans les schémas de la figure 7A. (Buchwald et al., 2013).

CWC22, une protéine de 908 acides aminés, est recrutée dans le complexe B et est essentielle à l'activation de la première étape d'épissage (Yeh et al., 2011). Au laboratoire, nous avons identifié CWC22 en recherchant de nouveaux partenaires d'eIF4A3 par immunoprécipitation dans des cellules de drosophile en culture. CWC22 fut la principale protéine détectée suggérant que CWC22 est l'un des partenaires principaux d'eIF4A3 dans ces cellules (Barbosa et al., 2012). Nous avons alors produit des anticorps spécifiquement dirigés contre CWC22 et montré que CWC22 est également associée à eIF4A3 dans des cellules humaines (Barbosa et al., 2012). Des expériences de fractionnement d'extraits cellulaires à l'aide de gradient de glycérol ont montré que les deux complexes existent, eIF4A3/CWC22 d'une part et l'EJC d'autre part et qu'ils sont mutuellement exclusifs. Par des expériences de microscopie, nous avons montré une co-localisation nucléaire des protéines CWC22 et eIF4A3, avec une concentration des protéines autour de foyers nucléaires appelés « *nuclear speckles* » dans lesquels sont stockés de nombreux facteurs d'épissage (Barbosa et al., 2012). La transcription et la maturation des ARN pré-messagers ont lieu à la périphérie de ces foyers correspondant aussi aux sites d'assemblage de l'EJC (Daguenet et al., 2012).

3.2.2 Structure du CWC22/eIF4A3

Chez l'homme, nous avons pu montrer, par des expériences *in vivo* mais également *in vitro*, à l'aide de tests d'interaction médiés par des protéines recombinantes, que la protéine CWC22 interagit directement avec la protéine eIF4A3. Cette association se fait entre le domaine MIF4G de CWC22 et une région spécifique à la surface d'eIF4A3. La reconstitution *in vitro* du complexe CWC22/eIF4A3 a permis de montrer que l'interaction de CWC22 avec eIF4A3 n'est pas compatible avec la formation du cœur de l'EJC car CWC22 prévient l'interaction d'eIF4A3 avec l'ARN (Barbosa et al., 2012). Enfin, la résolution de la structure tridimensionnelle du dimère par cristallographie, a confirmé que la protéine CWC22 maintient la protéine eIF4A3 dans une conformation ouverte très différente de la conformation fermée adoptée par la protéine eIF4A3 dans le cœur de l'EJC (Buchwald et al., 2013; **Figure 7**).

3.2.3 CWC22 escorte eIF4A3 dans le spliceosome

Des tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que la protéine CWC22 est essentielle au recrutement de la protéine eIF4A3 par le spliceosome (Barbosa et al., 2012; Steckelberg et al., 2012). En effet, en absence de CWC22, la protéine eIF4A3 n'est pas incorporée par la machinerie d'épissage, prévenant ainsi toute formation de l'EJC. D'autre part, la réduction *in vivo*, de l'expression de CWC22 par l'utilisation d'ARN interférents dans des cellules humaines confirme elle aussi que CWC22 est bien nécessaire à l'épissage et au dépôt de l'EJC.

Nous avons alors proposé le modèle suivant pour expliquer l'assemblage de l'EJC par le spliceosome. CWC22 escorte eIF4A3 vers la machinerie d'épissage au niveau du complexe B. En maintenant eIF4A3 dans une position ouverte, CWC22 empêche l'interaction d'eIF4A3 de manière non-spécifique avec des ARN nucléaires. Par un mécanisme encore inconnu, CWC22 doit se dissocier d'eIF4A3 qui peut alors fixer une molécule d'ATP et interagir avec l'ARN en amont de la jonction exonique. Ce changement conformationnel permet la fixation du dimère Magoh/Y14 qui stabilise le complexe avec MLN51.

4. RESULTATS PRELIMINAIRES : IDENTIFICATION DE PARTENAIRES DE CWC22 ET EIF4A3

Nos analyses de fractionnement cellulaire par gradient de glycérol révèlent que le complexe CWC22/eIF4A3 est plus grand que l'EJC lui-même (Barbosa et al., 2012; Figure 1e en Annexe). Ces résultats suggèrent donc fortement que eIF4A3 et CWC22 sont associés à d'autres protéines et formant un complexe de plus grande taille. Pour caractériser la composition de ce complexe et mieux comprendre sa fonction, notre laboratoire a tenté d'identifier les partenaires protéiques de CWC22 et de eIF4A3. Pour cela chaque protéine a été immunoprécipitée (IP) indépendamment puis les éluâts ont été analysés par spectrométrie de masse quantitative.

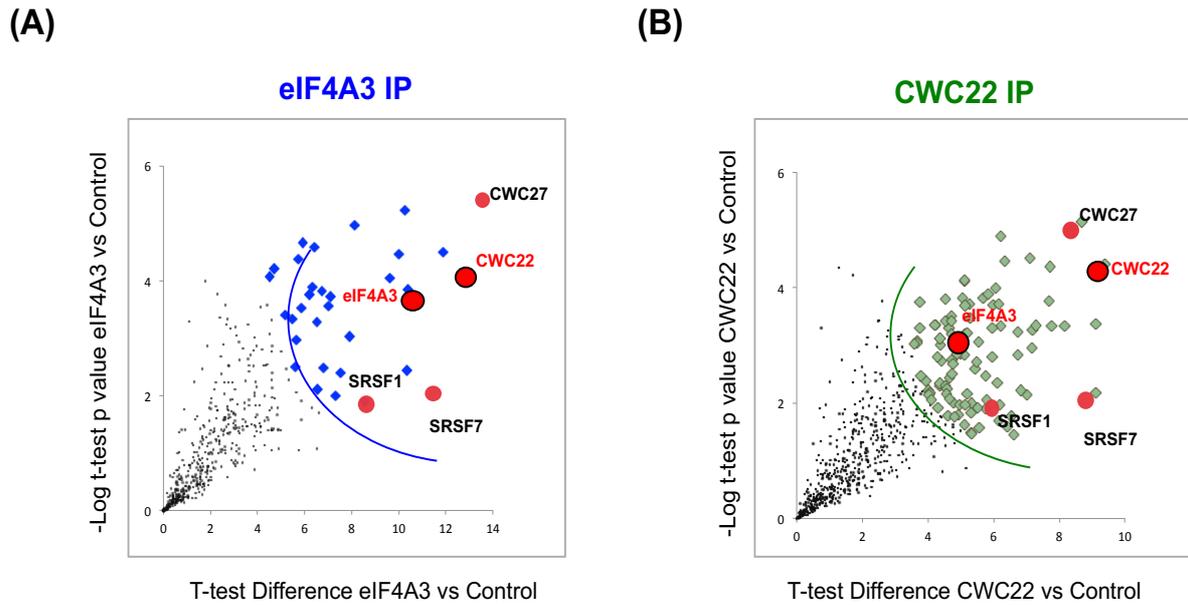


Figure 8 : Résultats de la spectrométrie de masse des protéines associées à eIF4A3 et CWC22.

(A) Résultats de la spectrométrie de masse pour l'immunoprécipitation d'eIF4A3. **(B)** Résultats de la spectrométrie de masse pour l'immunoprécipitation de CWC22.

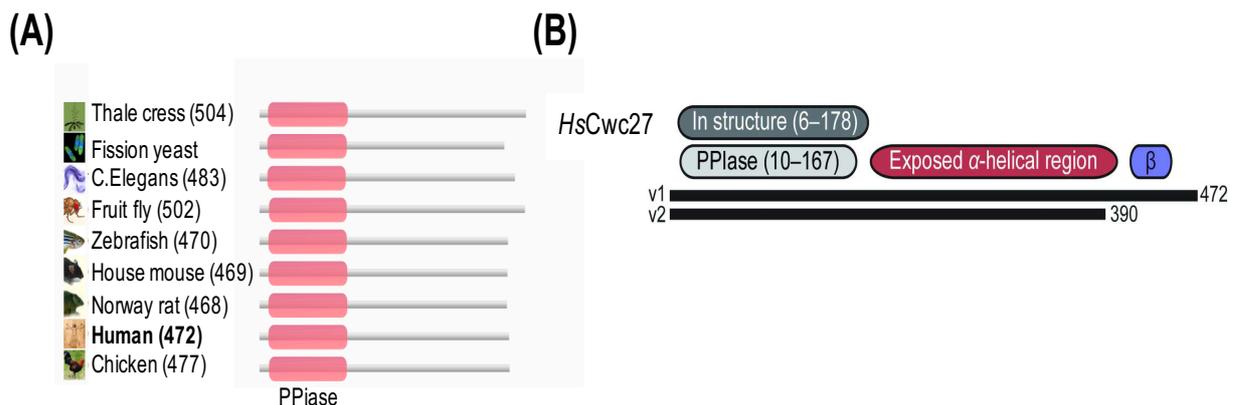


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine CWC27.

(A) CWC27 contient un domaine PPase conservé dans différentes espèces, chiffres en () = taille de la protéine en acides aminés. **(B)** Représentation schématique de la protéine CWC27 humaine.

L'analyse de ces complexes a permis d'établir une longue liste de partenaires potentiels. Parmi ceux-ci, plusieurs membres de la famille des protéines SR et la protéine CWC27 (**Figure 8**) sont retrouvés de manière particulièrement abondante.

4.1 Les protéines SR (Serin Rich)

Les protéines SR constituent une famille de protéines nucléaires qui jouent un rôle essentiel dans l'épissage et notamment dans l'épissage alternatif. Certaines protéines SR sont également impliquées dans d'autres processus post-transcriptionnels comme le transport, la traduction et la dégradation des ARNm (Long and Caceres, 2009). Elles sont composées d'un ou deux domaines RRM (RNA Recognition Motif) dans leur partie N-terminale ce qui permet leur fixation spécifique sur l'ARN et d'un domaine RS riche en sérine et arginine, dans leur partie C-terminale. L'étude de l'interaction de certaines de ces protéines avec CWC22 et eIF4A3 est en cours au laboratoire. Des résultats préliminaires montrent que deux protéines SR (SRSF1 et SRSF7) se lient spécifiquement à CWC22. Ces travaux suggèrent que certaines protéines SR pourraient guider les protéines eIF4A3 et CWC22 vers certaines jonctions exoniques des ARN.

4.2 La protéine CWC27

La protéine la plus abondante détectée par spectrométrie de masse est la protéine CWC27 qui est un facteur d'épissage dont la fonction précise est encore inconnue. CWC27 est une peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de type cyclophiline (PPIase) très conservée chez les eucaryotes (**Figure 9A**). Chez l'homme, elle existe sous deux isoformes, l'une de 472 aa et l'autre de 390 aa. Le domaine PPIase présent dans la région N-terminale (10-167) de la protéine est probablement inactif car des résidus essentiels du site catalytique ne sont pas conservés chez CWC27. Ce domaine est suivi par une longue région non structurée (**Figure 9B**).

Des mutations affectant le gène CWC27 sont également impliquées dans plusieurs pathologies humaines. Les patients portant ces mutations sont atteints de

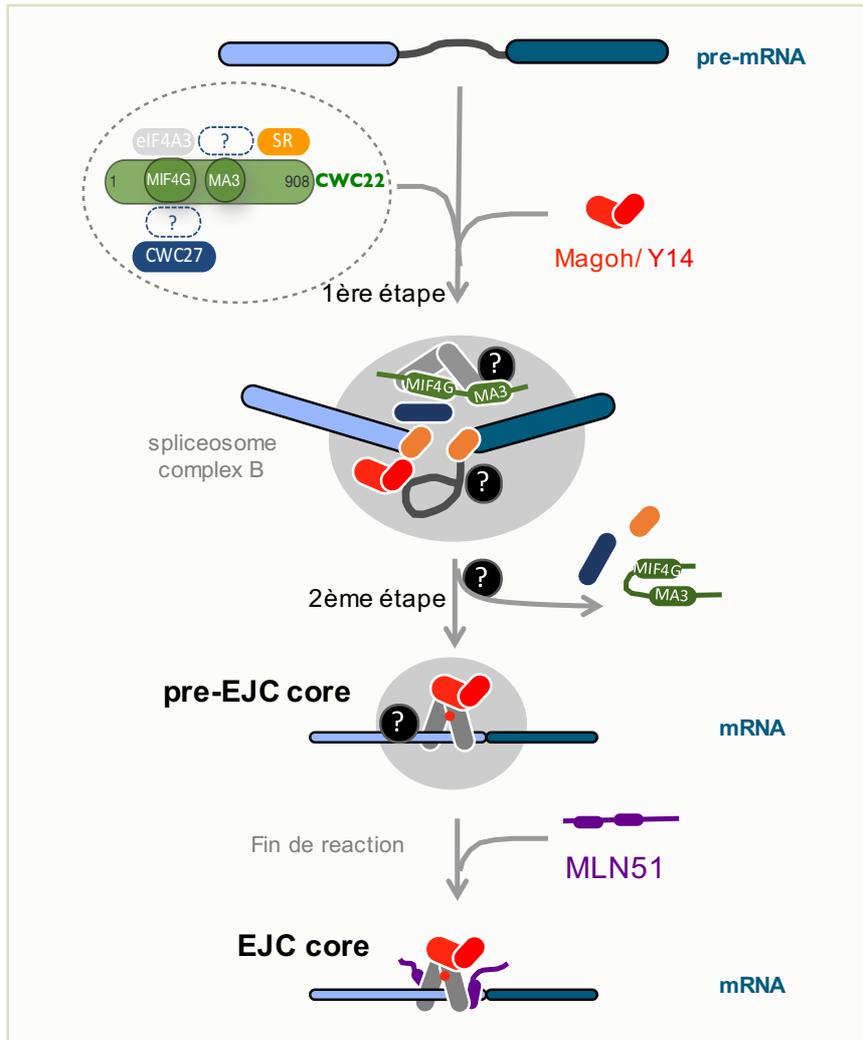


Figure 10 : Représentation schématique du modèle d'étapes de l'assemblage de l'EJC.

dégénérescence rétinienne, de brachydactylie, de défauts de croissance, d'une dysmorphie crâniofaciale et d'anomalies neurologiques comme une déficience intellectuelle légère et des retards psychomoteurs (Xu et al., 2017). Il est intéressant de noter que certains phénotypes associés aux mutations de CWC27 sont similaires à ceux associés aux mutations d'eIF4A3 comme notamment des dysmorphies crâniofaciales et les défauts rétiniens.

5. OBJECTIF DU PROJET DE RECHERCHE

Les cartographies des sites de liaison de l'EJC dans des cellules humaines par des méthodes de séquençage à large échelle ont montré que l'EJC n'est pas déposé sur chaque jonction (Saulière et al., 2012; Singh et al., 2012). D'autre part, des défauts d'expression des composants de l'EJC conduisent à des phénotypes précis et parfois similaires. Il est donc fort probable que la régulation de l'assemblage de l'EJC contribue à la régulation de l'expression de gènes spécifiques. Le projet de notre équipe est donc de déterminer les acteurs et les mécanismes responsables de ces régulations.

Dans ce cadre, mon objectif est de confirmer biochimiquement l'existence d'un complexe, considéré comme un « pré-EJC » et de caractériser sa composition et sa structure. (**Figure 10**). Ces travaux seront essentiels pour disséquer les mécanismes responsables du dépôt différentiel de l'EJC et permettront ainsi d'avoir une meilleure compréhension du rôle de l'EJC dans la régulation de l'expression des gènes que ce soit dans des contextes physiologiques ou pathologiques.

Dans la partie qui suit, je développerai dans une première partie mes approches expérimentales *in vivo* afin de confirmer le complexe formé par ces trois protéines CWC22, CWC27 et eIF4A3. Je présenterai la mise au point de l'immunoprecipitation de la protéine CWC27 afin d'isoler en conditions natives ce complexe et dans le but permettant de connaître ses nouveaux partenaires. Puis, dans une seconde partie, j'effectuerai des expériences *in vitro* dans l'objectif de déterminer une interaction directe entre ces deux protéines CWC22 et CWC27.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

1. BIOLOGIE MOLECULAIRE

1.1 Clonage de plasmides bactériens

1.1.1 PCR « Touchdown »

Afin de réaliser nos PCR, nous utilisons un programme dit de « touchdown » dont la température d'hybridation décroît progressivement à chaque cycle. Ce programme permet ainsi de s'affranchir d'un calcul de température. Toutes les PCR sont réalisées à l'aide de l'enzyme Phusion, une enzyme d'haute-fidélité (Fermentas), fournie avec deux tampons : HF (Haute-Fidélité) et GC (Faible Fidélité mais plus efficace pour les séquences riches en GC).

Réaction PCR	ADN matriciel (10ng/μL)	1μL
	Oligo sens (100μM)	0.5μL
	Oligo antisens (100μM)	0.5μL
	Tampon 5X	10μL
	dNTP (2mM chaque)	5μL
	H ₂ O	32.5μL
	Enzyme Phusion	0.5μL
	Total	50μL

- Contrôler le produit PCR par dépôt de 5μL sur gel d'agarose TBE 0,8-2%.

1.1.2 Digestion et purification des fragments digérés

Extraction Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamyl (PCI)

- Ajouter 15μL d'acétate de sodium (NaAc 3M pH5.2) et 100μL de H₂O.
- Ajouter 150μL (1 volume) de PCI (24 :24 :1 v/v, Ambion).
- Vortexer deux fois 10 secondes.
- Centrifuger 1 minute à 14000rpm.
- Collecter la phase aqueuse (phase supérieure).

Précipitation à l'éthanol

- Ajouter 450µL (3 volumes) de EtOH 100% et 2µL de glycogène carrier à 2µg/µL. Vortexer et incuber 20 minutes à -80°C (ou > 1h à -20°C).
- Centrifuger 15 minutes à 14000rpm, 4°C.
- Eliminer le surnageant et ajouter 250µL de EtOH 75% pour laver le culot.
- Centrifuger 2 minutes à 14000rpm.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot à 37°C.
- Resuspendre dans 50µL H₂O.

Digestion du produit PCR

- Digérer 2µg (environ 10µL) de produit PCR dans le mélange suivant :

Digestion Vecteur	ADN (2µg)	XµL
	Tampon 10X	5µL
	Enzyme 1 (20U/µL)	2µL
	Enzyme 2 (20U/µL)	2µL
	H ₂ O	qsp 50µL
	Total	50µL

- Incuber 3 heures à 37°C.

Digestion du vecteur

- Digérer 2µg de vecteur dans le mélange ci-dessus
- Incuber 2h à 37°C. Ajouter 1µL de CIP (Calf Intestinal Phosphatase).
- Incuber 1 heure à 37°C.

Purification des produits digérés

- Déposer la totalité du mélange de digestion (50µL+10µL de bleu de dépôt 6X) sur gel d'agarose TBE 0,8-2%.
- Migrer à 80V. Découper les bandes au scalpel.
- Extraire l'ADN en utilisant le kit de purification Promega.
- Nanodroper les échantillons.

1.2 Ligation

Réaliser la ligation du produit PCR et du vecteur digéré :

Réaction Ligation		
	Vecteur	50ng
	Insert	X
	Tampon T4 DNA Ligase 10X	1.5µL
	Enzyme T4 DNA Ligase	0.8µL
	H ₂ O	qsp 15µL
	Total	15µL

- La quantité d'insert est déterminée de telle sorte qu'il y ait trois fois plus de quantité de matière d'insert que vecteur :

Quantité insert (ng) :

$$3 \times (\text{Quantité vecteur (50ng)} / \text{Taille vecteur (nt)}) \times \text{Taille insert (nt)}$$

- Transformer la moitié du produit de ligation dans des bactéries MH1.

1.3 Transformation de bactéries compétentes MH1 : clonage

- Décongeler les bactéries dans la glace 30 minutes et sortir les boîtes de culture.
- Préparer x tubes avec 10 µL de produit de ligation dans la glace.
- Ajouter 100µL de bactéries compétentes à la flamme.
- Mélanger (sans vortexer). Laisser 10 minutes dans la glace.
- Incuber 2 minutes à 42°C. Ajouter 600µL de LB et mettre 1h à 37°C.
- Etaler 250µL sur boîte LB-Ampicilline/Kanamycine avec les billes.
- Mettre à 37°C durant la nuit.

1.4 Mini et Midi préparation d'ADN plasmidique

Les mini ou midi-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées grâce aux kits Qiagen® Plasmid Purification (Qiagen) ou Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel).

1.5 Séquençage

Les plasmides préparés ont été séquencés par la compagnie GATC en utilisant les amorces proposées et présentes dans le vecteur.

2. BIOCHIMIE

2.1 Migration des gels

Les mélanges protéiques à analyser ont été résolus par SDS-PAGE sur des gels Tris-Glycine de 8% à 13.5% ou sur des gels Bis-Tris gradients pré-coulés 4-12% (Life Technologies).

Resolving	8 %	10 %	12 %	13.5 %	Stacking	
Tris pH 8.8 1M	1.88mL	1.88mL	1.88mL	1.88mL	Tris pH 6.8 1M	315µL
30% Acryl/bis. (37.5/1)	1.34mL	1.67mL	2.00mL	2.25mL	30% Acryl/bis. (37.5/1)	415µL
H ₂ O	1.67mL	1.34mL	1.01mL	0.77mL	H ₂ O	1.72mL
10 % SDS	50µL	50µL	50µL	50µL	10 % SDS	25µL
10 % APS	50µL	50µL	50µL	50µL	10 % APS	50µL
TEMED	10µL	10µL	10µL	10µL	TEMED	10µL

- Ajouter 10µL d'ammonium persulfate 10% (0,01% final) préparé extemporanément et 10µL TEMED 100% (0,1% final)
- Polymériser au minimum 2 heures ou sur la nuit en couvrant les capillaires de parafilm (car l'oxygène gêne la polymérisation).
- Placer alors les gels dans la cuve d'électrophorèse (Biorad).
- Déposer les échantillons mixer au Bleu de dépôt (tampon de charge et de dénaturation) et chauffer 10min à 95°C. Migrer environ 2h à 150V.

2.2 Méthodes de révélation des protéines

2.2.1 Coloration au bleu de Coomassie : InstantBlue™ Protein Stain (Expedeon)

- Laver les gels à l'eau pendant 1h.
- Ajouter « InstantBlue™ Protein Stain » jusqu'à apparition des bandes.
- Rincer à l'eau.

2.2.2 Western Blot

PBS-T	Stock	Volume
1X PBS (Euromedex)	10X	100mL
0.05% Tween-20	100%	0.5 mL
H ₂ O		qsp 1L
Total		1L

PBS-T-Lait 10%	Stock	Volume
10 g de lait entier en poudre (Régilait)		10g
PBS-T		qsp 100mL
Total		100mL

Transfert des protéines

Suite à l'électrophorèse, les gels révélés par immunoblotting ont été transférés sur membrane de nitrocellulose Protran-BA83® (Amhersam) en utilisant le système de transfert semi-liquide « Fast western blot transfer » (Pierce). Le transfert est réalisé à l'aide d'un tampon « Pierce 1-Step Transfer Buffer » durant 15min.

NB : Le transfert des protéines, chargées négativement par le SDS, se faisant du pôle « - » vers le pôle « + », il est nécessaire de bien faire attention de positionner le gel sur la face « - » de la cassette.

Immunoblotting

- Bloquer les membranes pendant 30 minutes minimum dans du PBS-T (1X Phosphate Buffer Saline (PBS, Euromedex), 0.05% Tween-20 (Euromedex)) supplémenté avec du lait entier en poudre (10% p/v, Régilait).
- Enlever le PBS-T-Lait et laver brièvement la membrane avec du PBS-T.
- Incuber durant 1 heure avec l'anticorps primaire dilué dans un mélange PBST-Lait 5%.
- Enlever l'anticorps primaire et laver brièvement 3 fois la membrane avec du PBS-T durant 1 minute.
- Incuber avec l'anticorps secondaire dilué dans un mélange PBS-T-Lait 5%.
- Enlever l'anticorps secondaire et laver l'excédent avec du PBS-T.
- Laver la membrane 3 fois 1 minutes avec du PBS-T.

- Révéler la membrane avec une solution de révélation appropriée (Pierce West Pico ou Pierce West Femto, Thermofisher).

La révélation des membranes a été réalisée à l'aide d'un LAS4000 mini (GE Healthcare).

***NB1** : La révélation s'effectue généralement à l'aide du kit Femto qui détecte jusqu'à la femtomole de protéine. Ce dernier permet de visualiser des signaux très faibles, qui ne seraient pas obtenus avec des kits moins sensibles, tout en permettant une révélation bien plus rapide.*

Préparation d'anticorps purifiés

Les anticorps sont préparés à l'aide de sérum de lapin fournis par notre collaboratrice Catherine Tomasetto.

Tampon T50E5	50 mM Tris-HCl (Sigma) pH7.5 5 mM Na ₂ EDTA
Tampon T10 pH7.5	10 mM Tris-HCl (Sigma) pH7.5
Tampon T10 pH8.8	10 mM Tris-HCl (Sigma) pH8.8

Colonne

- Placer 1mL de résine SulfoLink (#20402, Thermofisher) dans une colonne PolyPrep (Biorad) de 10 mL.
- Laver la résine avec 6mL de tampon T50E5.
- Fermer la colonne de part et d'autre avant assèchement.

Peptide

- Préparer 1mL de peptide synthétique à 2mg/mL dans du tampon T50E5.
- Ajouter le peptide dilué à la résine et agiter sur roue 15 min à température ambiante.
- Laisser la colonne reposer pendant 30 min hors agitation.
- Éliminer l'excès de peptide par gravité puis laver avec 3mL de T50E5.

Saturation

- Fermer la colonne et ajouter 1mL de Cystéine 50mM. Fermer la colonne et agiter sur roue 15 min à température ambiante.
- Laisser la colonne reposer pendant 30 min hors agitation.

- Éliminer le tampon.
- Laver avec :
 - 16mL de NaCl 1M.
 - 10mL de tampon T10 pH7.5.
 - 10mL de Glycine 0.1M pH2.5.
 - 10mL de tampon T10 pH8.8.
 - 10mL de Triéthylamine 0.1M pH11.5.
 - 10mL de tampon T10 pH7.5.
- Contrôler le pH (7.5) et fermer la colonne.

Liaison du sérum

- Diluer 2mL de sérum dans 8mL de tampon T10 pH7.5.
- Conserver 100µL pour tester le sérum et incuber le sérum sur la colonne 10-16h en rotation à 4°C.
- Vider la colonne (conserver un aliquote, FT).
- Laver avec :
 - 10mL de tampon T10 pH7.5 (W1).
 - 10mL de tampon T10 pH7.5 (W2).
 - 10mL de NaCl 0.5M (W3).
 - 10mL de NaCl 0.5M (W4).
- Éliminer le tampon et préparer un Falcon™ avec 1mL de Tris-HCl pH8.0 à 1M.
- Éluer la colonne avec 9mL de Glycine 0.1M pH2.5 (Élution Acide).
- Laver la colonne avec 10mL de tampon T10 pH8.8.
- Éliminer le tampon et préparer un Falcon™ avec 1mL de Tris-HCl pH8.0 à 1M.
- Éluer la colonne avec 9mL de Triéthylamine 0.1M pH11.5 (Élution Basique).
- Laver la colonne avec 10mL de tampon T10 pH8.0.

***NB1** : Tester les éluions en Western Blot. Tous nos anticorps ont été élués lors de l'éluion acide par la Glycine.*

***NB2** : Conserver les anticorps aliquotés à -20°C en ajoutant 0.05% de Sodium Azide.*

Régénération de la colonne

- Laver la colonne avec 20mL de tampon T10 pH7.5.
- Laver la colonne avec 0.05% de Sodium Azide.
- Laisser 1mL de liquide et conserver la colonne à 4°C pour une utilisation ultérieure.

2.3 Purification de protéines

2.3.1 Expression bactérienne

Transformation de BL21Codon+ : expression protéique

- Décongeler les bactéries dans la glace 30 minutes et sortir les boîtes de culture.
- Préparer x tubes avec 200ng à 1µg d'ADN dans la glace.
- Ajouter 100µL de bactéries compétentes à la flamme.
- Mélanger (sans vortexer). Laisser 10 minutes dans la glace.
- Incuber 2 minutes à 42°C. Ajouter 600µL de LB et mettre 1h-1h30 à 37°C.
- Centrifuger 2 minutes à 4000rpm. Retirer 500µL de milieu et reprendre le culot à la pipette.
- Étaler la totalité sur boîte LB-Ampicilline/Kanamycine avec les billes.
- Mettre à 37°C durant la nuit.

Culture des bactéries

- Lancer une culture de 25ml de LB avec antibiotiques (Ampicilline/Kanamycine) tôt le matin avec quelques colonies, 5h à 37°C sous agitation à 180rpm.
- En début d'après-midi, inoculer une culture de 1L de LB ou TB avec les antibiotiques à 37°C avec la culture de 25mL.
- Atteindre une Densité Optique à 600nm (DO_{600}) comprise entre 0.5 et 0.6, et mettre la culture à 16°C pendant 30 minutes au moins.
- Lorsque la DO_{600} atteint 0.8 (LB) ou 2 (TB), ajouter l'IPTG (0.5mM final pour LB et 0,2mM final pour TB) pour induire l'expression de la protéine recombinante.
- Incuber la culture à 16°C sur la nuit.

2.3.2 Lyse bactérienne

Cocktail	Concentration Finale	Stock
<i>Anti-protéases</i>	2 µg/mL Aprotinin	1.7 mg/mL
	1 µg/mL Leupeptin	1 mg/mL
	1 µg/mL Pepstatin A	1.6 mg/mL
	50 µg/mL PMSF	17 mg/mL

Tampon de Lyse	Concentration Finale	Stock	Volume
	1.5X PBS	10X	150mL
	1mM MgAc ₂	1M	1mL
	20mM Imidazole	2M	10mL
	0.1% NP-40	10%	10mL
	10% Glycérol	100%	100g
	Anti-protéases		
	H ₂ O		qsp 1L
	Total		1L

- Centrifuger les cellules à 6000rpm pendant 10 minutes à 4°C (à partir de cette étape, conserver les cellules à 4°C en permanence).
- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 25mL de PBS1X maintenu à 4°C.
- Centrifuger à nouveau 10 minutes à 6000rpm, 4°C.
- Peser le culot (il doit être faire en 3 et 6g) et le conserver dans la glace ou à -80°C.
- Resuspendre les cellules dans 25mL de Tampon de Lyse.
- Ajouter un cocktail d'inhibiteur de protéases et du lysozyme (1X final, Sigma).
- Incuber dans la glace 15 minutes.
- Lyser les cellules par sonication en maintenant le Falcon™ dans un mélange glace EtOH : 4 fois 1 minute de pulse à 30% d'amplitude (1 seconde de pulse/1 seconde de repos). Éviter à tout prix la formation de mousse et arrêter la lyse prématurément au besoin.
- Centrifuger le lysat à 18000rpm, 4°C pendant 30 minutes.

- Collecter le surnageant en veillant à ne pas pipeter de fragment du culot. Prélever un échantillon de 10µL pour analyse ultérieure (S).
- Resuspendre le culot dans 25mL de SDS 1% et prélever un échantillon de 10µL pour analyse ultérieure (P).

2.4 Purification sur résine de Nickel

Cette étape permet de purifier la protéine recombinante contenant une étiquette 6 Histidines.

Tampon Lavage	Concentration Finale	Stock	Volume
<i>Ni</i>	1.5X PBS	10X	15mL
	250mM NaCl	5M	5mL
	1mM MgAc ₂	1M	100µL
	50mM Imidazole	2M	2.5mL
	0.1% NP-40	10%	1mL
	10% Glycérol	100%	10g
	H ₂ O		qsp 100mL
	Total		100mL

Tampon Elution	Concentration Finale	Stock	Volume
<i>Ni</i>	1.5X PBS	10X	15mL
	1mM MgAc ₂	1M	100µL
	150mM Imidazole	2M	7.5mL
	0.1% NP-40	10%	1mL
	10% Glycérol	100%	10g
	Anti-protéases		
	H ₂ O		qsp 100mL
	Total		100mL

Toutes les étapes qui suivent doivent être réalisées en chambre froide à 4°C :

- Laver 250µL de billes de Nickel (Qiagen) (à partir de 500µL de solution à 50%) deux fois dans 10mL de Tampon de Lyse (centrifugation 1 minute à 1500 rpm).
- Incuber le surnageant issu du lysat cellulaire avec la résine de Nickel et incuber pendant 2 heures sur roue à 4°C.
- Centrifuger les billes à 1500rpm pendant 5 minutes.
- Prélever 10µL du surnageant (Surnageant Ni) puis éliminer le reste.

- Laver les billes avec 20mL de Tampon de Lyse.
- Centrifuger à 1500rpm pendant 5 minutes.
- Enlever un maximum de surnageant, ajouter 5mL de Tampon de Lyse et transférer la résine dans une colonne PolyPrep (Biorad).
- Laisser passer le Tampon de Lyse au travers de la colonne.
- Laver la colonne avec 500µL de Tampon de Lavage Ni puis 5mL de Tampon de Lyse.
- Boucher la colonne et ajouter 800µL de Tampon d'Elution Ni.
- Attendre 5 minutes, récolter l'éluât.
- Finir l'élution en ajoutant 4 nouvelles fois 800µL de Tampon Elution Calmoduline.
- Mesurer la concentration des éluations au Bradford.
- Collecter les fractions d'intérêt ($C > 0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et diluer le mélange avec du tampon d'élution pour que la concentration n'excède pas $1.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sans quoi les protéines précipiteront pendant la dialyse).
- Dialyser les échantillons dans le tampon désiré sur la nuit à 4°C sous agitation à l'aide d'une membrane Spectrapor-4 : 12-14MWCO.

S'il n'y a pas de purification Calmoduline, dialyser dans le Tampon Dialyse, stocker et conserver à -80°C.

2.5 Purification sur résine de Calmoduline

Cette purification est efficace comme deuxième étape d'isolation de la protéine d'intérêt après une première purification sur résine de Nickel. Elle se base sur l'interaction entre l'étiquette CBP et la calmoduline, via un ion calcium Ca^{2+} . Cette interaction est rompue par l'ajout d'EGTA, qui permet d'éluer la protéine d'intérêt après une série de lavages.

Tampon Dialyse	Concentration Finale	Stock	Volume
<i>Calmoduline</i>	10mM Tris-HCl pH 7.5	1M	10mL
	250mM NaCl	5M	50mL
	1mM MgAc ₂	1M	1mL
	1mM DTT	1M	1mL
	4mM CaCl ₂	1M	4mL
	0.05% NP-40	10%	5mL
	10% Glycérol	100%	100g
	H ₂ O		qsp 1L
Total			1L

Tampon Elution	Concentration Finale	Stock	Volume
<i>Calmoduline</i>	10mM Tris-HCl pH 7.5	1M	1mL
	250mM NaCl	5M	5mL
	1mM MgAc ₂	1M	100µL
	1mM DTT	1M	100µL
	20mM EGTA	0.5M	4mL
	0.05% NP-40	10%	500µL
	10% Glycérol	100%	10g
	H ₂ O		qsp 100mL
Total			100mL

Tampon Dialyse	Concentration Finale	Stock	Volume
<i>Stockage</i>	1.5X PBS	10X	150mL
	1mM MgAc ₂	1M	1mL
	2mM DTT	1M	2mL
	10% Glycérol	100%	100g
	H ₂ O		qsp 1L
Total			1L

- Dialyser les échantillons dans 1L de Tampon Dialyse Calmoduline sur la nuit à 4°C.
- Laver 500µL de résine de Calmoduline (50%) dans du tampon CBB.
- Mélanger les billes à l'échantillon dans une colonne PolyPrep (Biorad).

- Incuber 2h sur roue à 4°C. Laver 2 fois avec 5mL de Tampon Dialyse Calmoduline.
- Éluer avec 500µL de Tampon Élution Calmoduline 3-5 fois (Attendre 5 min avant la première élution). Mesurer la concentration au Bradford.

Dialyser l'échantillon dans le Tampon Dialyse Stockage 3h à 4°C sous agitation à l'aide d'une membrane Spectrapor-4 : 12-14MWCO. Aliquoter et conserver à -80°C.

2.6 Interaction in vitro

2.6.1 Pré-blocage préalable de la résine de Calmoduline

Tampon Pré-blocage Calmoduline	Stock	Volume
20mM Hepes pH7.5	2M	200µL
150mM NaCl	5M	300µL
0.1% NP-40	10%	100µL
H ₂ O	-	9.4mL
	Total	10mL

- Prélever 1mL de résine de Calmoduline (Stratagène).
- Centrifuger 1 minute à 3000rpm, 4°C.
- Éliminer le surnageant et ajouter 900µL de Tampon de Pré-blocage.
- Centrifuger 1 minute à 3000rpm, 4°C.
- Éliminer le surnageant et ajouter 500µL de Tampon de Pré-blocage, 50µL de NaCl (5M), 25µL de Glycogène carrier (2µg/µL), 5µL d'ARNt (10µg/µL), 50µL BAS (10µg/µL).
- Incuber sur roue 2h à 4°C.
- Laver trois fois la résine avec 900µL de Tampon de Pré-blocage.
- Centrifuger 1 minute à 3000rpm, 4°C.
- Resuspendre les billes dans 500µL de Tampon BB1X 125/10 et stocker à 4°C.

2.6.2 Interactions directes sur résine de Calmoduline

Tampons d'interactions

B1.5	Stock	Volume
1.5X PBS	10X	1.5mL
1mM MgAc ₂	1M	10μL
10% glycérol	50%	2mL
2mM DTT	1M	20μL
H ₂ O	-	6.47mL
	Total	10mL

BB2X 70/12.5	Stock	Volume
40mM Hepes pH7.5	1M	400μL
70mM NaCl	5M	140μL
4mM MgAc ₂	1M	40μL
4mM Imidazole	2M	20μL
4mM CaCl ₂	1M	40μL
0.2% NP-40	10%	200μL
12.5% glycérol	50%	2.5mL
2mM DTT	1M	20μL
H ₂ O	-	6.64mL
	Total	10mL

BB1X 125/10	Stock	Volume
20mM Hepes pH7.5	1M	800μL
125mM NaCl	5M	1.25mL
2mM MgAc ₂	1M	80μL
2mM Imidazole	2M	40μL
2mM CaCl ₂	1M	80μL
0.1% NP-40	10%	400μL
10% glycérol	50%	8mL
1mM DTT	1M	40μL
H ₂ O	-	28.56mL
	Total	40mL

Tampon Elution	Stock	Volume
10mM Tris pH7.5	1M	10 μ L
150mM NaCl	5M	30 μ L
1mM MgAc ₂	1M	1 μ L
2mM Imidazole	2M	1 μ L
20mM EGTA	0.5M	40 μ L
0.1% NP-40	10%	10 μ L
14% glycérol	50%	280 μ L
10mM β -mercaptoethanol	1M	0.7 μ L
H ₂ O	-	630 μ L
	Total	40mL

- Réaliser l'expérience en restant tout au long à 4°C.
- Réaliser les combinaisons de protéines désirées dans des tubes Eppendorf refroidis à 4°C.
- Compléter chaque combinaison avec du B1.5 pour avoir un volume identique dans chaque tube.
- Ajouter de l'ARN et/ou de l'ADPNP si nécessaire dans un volume final de 5 μ L.
- Ajouter un volume équivalent de Tampon BB2X dans chaque tube. La concentration en sel est alors de 125mM et 10% de Glycérol.
- Incuber sur roue 2 heures (minimum) à 4°C.
- Ajouter 12 μ L de résine de Calmoduline pré-bloquée et 200 μ L de BB1X125/10.
- Incuber sur roue 1 heure à 4°C.
- Laver trois fois les billes avec 500 μ L de BB1X 125/10 (centrifugation 30 secondes à 2000 rpm).
- Assécher la résine en utilisant une pipette pasteur effilée.
- Ajouter 20 μ L de Tampon Elution, agiter dans un thermomixeur 5 minutes à 1400rpm, 30°C. Centrifuger 1 minute à 3000rpm et collecter l'éluât.
- Concentrer les échantillons au Speedvac si nécessaire.
- Ajouter du Bleu de dépôt et chauffer 5 minutes à 95°C. Déposer sur gel d'acrylamide.

2.7 Immunoprécipitation de protéines à partir d'extraits cellulaires

Extraction cellulaire

La préparation des extraits cellulaires est réalisée à partir de boîtes de culture de 15cm de cellules HeLa ou HEK293. Les volumes donnés ci-dessous se réfèrent donc à l'extraction du matériel contenu dans une boîte et doivent être adaptés selon le nombre et la taille des boîtes utilisées.

Protéase inhibiteur (PI)		100X	
	AEBSF	(100mM)	
	Aprotonine	(80µM)	
	Bestatin	(5mM)	
	E-64	(1,5mM)	
	Leupeptin	(2mM)	
	Pepstatin	(1mM)	
	Total		1mL

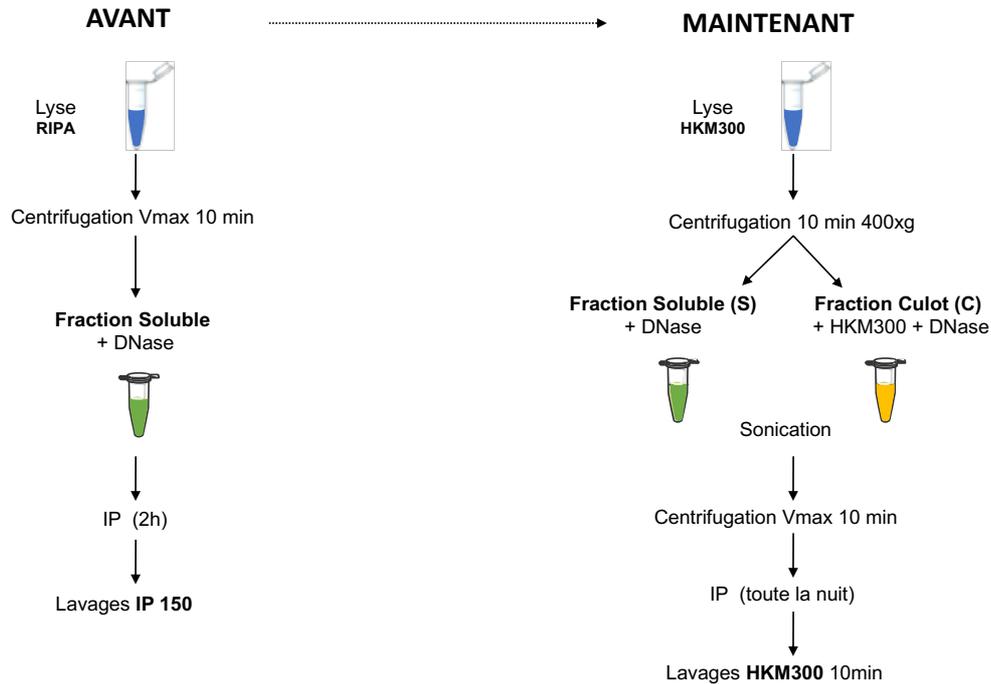
Tampon RIPA	Concentration Finale	Stock	Volume
(Extraction Totale)	20mM Tris-HCl pH 7.5	1M	1mL
	150mM NaCl	5M	1.5mL
	1mM Na ₂ EDTA	0.5M	100µL
	1mM EGTA	0.5M	100µL
	1% NP-40	10%	5mL
	1% Sodium Deoxycholate	10%	5mL
	Protéase Inhibiteur (PI)	1/100	5µL
	RQ1 DNase		10µL
	H ₂ O		qsp 50mL
Total			50mL

Tampon de Lyse Cytoplasmique	Concentration Finale		Volume
ou (HKM 300)	10mM Hepes pH 7.5	0,5M	1mL
	10mM KCl	2M	250µl
	1,5mM MgCl ₂	1M	75µL
	300mM NaCl	5M	3mL
	0,5% NP-40	10%	2,5mL
	0,2mM EGTA	0,5M	20µL
	Protéase Inhibiteur (PI)	1/100	5µl
	RQ1 DNase		10µL
	H ₂ O		qsp 50mL
	Total		50mL

Tampon IP150	Concentration Finale	Stock	Volume
	10mM Tris-HCl pH 7.5	1M	500µL
	150mM NaCl	5M	1.5mL
	2.5mM MgCl ₂	1M	125µL
	1% NP-40	10%	2.5mL
	Protéase Inhibiteur (PI)	1/100	5µL
	H ₂ O		qsp 50mL
	Total		50mL

- Aspirer le milieu de culture et laver une fois au PBS 1X.
- Ajouter 1mL de PBS1X et récolter les cellules à l'aide d'un grattoir.
- Centrifuger 2 minutes à 2000rpm et éliminer le surnageant.

Optimisation de la lyse cellulaire pour l'IP



Lyse totale :

- Resuspendre les cellules dans 600µL de tampon RIPA.
- Vortexer brièvement et centrifuger les cellules 10 minutes à 13000rpm.
- Collecter le surnageant et mesurer la concentration au Bradford (de 5 à 10µg/µL).
- Prélever 50µl pour analyse ultérieure (Extrait total).

Lyse cytoplasmique :

- Resuspendre les cellules dans 600µL de tampon de Lyse Cytoplasmique (HKM 300).
- Pipeter doucement et centrifuger les cellules 10 minutes à 400 xg.
- Collecter le surnageant et mesurer la concentration au Bradford (de 5 à 10µg/µL).
- Prélever 50µl pour analyse ultérieure (Extrait).

Immunoprécipitation

- Prélever 80µL de billes magnétiques Protein-A Dynabeads (Life Technologies) dans un Eppendorf.
- Retirer le tampon de stockage à l'aide du portoir magnétique.
- Laver 3 fois les billes avec 500µL de tampon IP150.

- Ajouter 5-20µg d'anticorps sur les billes et compléter à 400µL avec le tampon IP150.
- Incuber sur roue 1 heure à 4°C. Retirer l'anticorps à l'aide du portoir magnétique. Laver 3 fois les billes avec 500µL de tampon IP150 ou HKM300.
- Éliminer un maximum de tampon et ajouter l'extrait cellulaire.
- Incuber 2 heures sur roue à 4°C.
- Prélever 50µl pour analyse ultérieure (Surnageant).
- Laver les billes trois fois 5 minutes sur la roue avec 500µL de tampon IP150 ou HKM300.
- Éliminer un maximum de tampon et ajouter du Bleu de Dépôt 1X.
- Incuber 10 minutes à température ambiante.

3. BIOLOGIE CELLULAIRE

3.1 Cellules humaines HeLa et HEK293

3.1.1 Culture des cellules humaines HeLa et HEK293

Les cellules HeLa et HEK293 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dubelcco) à 4.5g/L de glucose, supplémenté par 10% de Sérum Foetal (FBS) et 1% d'un mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine.

Ensemencement d'une culture

- Décongeler une ampoule (-80°C) sur la paillasse.
- Mettre 10mL de milieu par boîte de 10cm.
- Ajouter 0.5 ou 1mL de l'ampoule par boîte.
- Incuber à 37°C, 5% CO₂.
- Attendre 80% confluence pour les repiquer en x boîtes.

Si la culture ne repart pas (non adhésion) récolter les cellules par centrifugation à 2000rpm 4 minutes, reprendre dans 10mL de milieu frais et remettre à 37°C.

Repiquage des cellules

- Placer la trypsine et le milieu à 37°C.
- Éliminer le milieu des boîtes à la pipette pasteur.
- Pré-rinçage avec 5mL de PBS1X, faire des oscillations, éliminer (permet de bien laver la boîte car le sérum peut inhiber la trypsine).

- Mettre 500µl de trypsine fraîche par boîte, incuber 5 minutes à 37°C.
- Détacher le voile cellulaire par oscillations et par pipetage.
- Additionner 10mL de milieu frais par boîte, reprendre les cellules dans tube Falcon™ (et compter sur lame de malassez).
- Centrifuger les cellules 4 minutes à 2000rpm, éliminer le milieu.
- Reprendre les cellules dans volume adéquat de milieu (10^6 cellules/mL).
- Mettre à 37°C, 5% CO₂.

Ampoule cellulaire

- Réserver plusieurs boîtes ($8 \cdot 10^6$ cellules = 2 ampoules)
- Pré-rincer la boîte avec 10mL de PBS1X.
- Trypsiner les cellules avec 500µL de trypsine.
- Reprendre les cellules dans 5mL milieu frais.
- Centrifuger 4 minutes à 2000rpm.
- Éliminer le surnageant, reprendre le culot dans 900µL FCS + 100µL DMSO.

Transférer dans les tubes à congélation et placer à -80°C , puis dans l'azote liquide.

3.1.2 Transfection de plasmides

La transfection des cellules pour étudier la surexpression d'une protéine est réalisée dans des cellules HEK293 ou HeLa. Le protocole est réalisé sur 24h ou 48h :

Mélange de transfection	Concentration Finale	Stock	Volume
(Plaque 24-puits)			
<i>Plasmides</i>	Plasmide surexpression	0.5µg	XµL
	JetPEI ou jetPRIME		1µL
	DMEM/tampon jetPRIME		50µL
	Total		50µL/puits

Déposer la quantité désirée ($\sim 1.5 \times 10^5$) de cellules HEK293 dans les puits d'une plaque 24 puits. Laisser les cellules adhérer 24h pour atteindre 50-60% de confluence.

- Réaliser les mélanges de transfection à l'aide de JetPEI ou jetPRIME selon les conditions du protocole. Vortexer et incuber 10-15 minutes à température ambiante.
- Ajouter goutte à goutte le mélange de transfection dans chaque puits.
- Attendre 24h ou 48h d'expression.

4. FLUORESCENCE

4.1 Immunofluorescence

4.1.1 Fixation des cellules pour observation indirecte

Préparation des cellules (plaque 24 puits)

- Déposer la quantité désirée ($\sim 2 \times 10^5$) de cellules HeLa dans les puits d'une plaque 24 puits.
- Laisser les cellules adhérer 24h pour atteindre 50-60% de confluence.

NB : Si besoin de surexprimer un plasmide, réaliser les mélanges de transfection à l'aide du jetPRIME selon les conditions du protocole ci-dessus et attendre 24h supplémentaire.

Fixation et immunofluorescence

- Aspirer le milieu de la plaque 24 puits.
- Laver au PBS 1X avec 1mL/puits.
- Aspirer.
- Fixer avec 500 μ L de PFA 4%/puits (solution stock à 32% soit 1ml de PFA dans 7mL de PBS) sous la sorbonne. Mettre sous agitation 15 minutes à température ambiante.
- Laver 3 fois au PBS 1X.
- Ajouter 1mL/puit de 2,5% Triton X-100 (solution stock à 100% soit 500 μ l dans 20mL de PBS) pendant 3 minutes puis 5min de 0,5% Triton X-100 (solution stock à 100% soit 100 μ L dans 20ml de PBS). Cette étape permet de perméabiliser les cellules.
- Laver 3 fois au PBS 1X
- Incuber pendant 20min avec du PBS 5% BSA (1ml/puit) sous agitation
- Incuber avec l'anticorps primaire pendant 1h.

Selon l'anticorps, l'incubation peut être faite toute la nuit à 4°C.

Mélange Ac primaire	Concentration Finale	Stock	Volume
	PBS 1X		358 µL
	BSA 0,3%	3%	40µL
	Tween 20 0,1%	100%	2µL
	Ac primaire (1/1000)		0,4µl
	Total		400µL/puits

- Faire 2 lavages de 5min au PBS1X
- Incuber avec l'anticorps secondaire pendant 1h

Mélange Ac secondaire	Concentration Finale	Stock	Volume
	PBS 1X		358 µL
	BSA 0,3%	3%	40µL
	Tween 20 0,1%	100%	2µL
	Ac secondaire (1/1000)		0,4µl
	Total		400µL/puits

- Faire 2 lavages de 5min au PBS1X
- Incuber 10-15min avec du DAPI (1,3ml DAPI+11,7ml PBS 1X au 1/10 final)
- Faire 2 lavages de 5 min au PBS 1X

Montage

- Déposer une goutte de milieu de montage sur la lame à l'aide d'un cône de P20.
- Ajouter la lamelle. Cellule côté milieu de montage, sur la lame.
- Attendre 20min à température ambiante.
- Sceller avec du vernis à ongle et stocker à -20°C.

4.1.2 Fixation des cellules pour observation directe

Préparation des cellules (plaque 24 puits)

- Déposer la quantité désirée ($\sim 2 \times 10^5$) de cellules HeLa dans les puits d'une plaque 24 puits.
- Laisser les cellules adhérer 24h pour atteindre 50-60% de confluence.

Fixation

- Aspirer le milieu de la plaque 24 puits.
- Laver au PBS 1X avec 1mL/puits.
- Aspirer.
- Fixer avec 500µL de PFA 4%/puits (solution stock à 32% soit 1ml de PFA dans 7mL de PBS) sous la sorbonne. Mettre sous agitation 15 minutes à température ambiante.
- Laver 3 fois au PBS 1X.
- Incuber 10-15min avec du DAPI (1,3ml DAPI+11,7ml PBS 1X au 1/10 final)
- Faire 2 lavages de 5 min au PBS 1X

Montage

- Déposer une goutte de milieu de montage sur la lame à l'aide d'un cône de P20.
- Ajouter la lamelle. Cellule côté milieu de montage, sur la lame.
- Attendre 20min à température ambiante.
- Sceller avec du vernis à ongle et stocker à -20°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. PURIFICATION D'UN COMPLEXE NATIF *IN VIVO*

1.1 Mise en place des outils pour l'immunoprécipitation

Notre objectif est d'isoler la protéine CWC27 liée à ses partenaires par la méthode d'immunoprécipitation (IP) à partir de cellules humaines en culture (HeLa). Nous avons produit des anticorps polyclonaux (de lapin) dirigés contre un peptide spécifique situé dans la partie N-terminale de la protéine. J'ai purifié ces anticorps par chromatographie d'affinité à partir du sérum et testé leur affinité pour CWC27. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement la protéine CWC27 par western blot c'est-à-dire lorsque la protéine est totalement dénaturée. Par contre, ils ont très peu d'affinité pour la protéine native et sont donc inutilisables pour des expériences d'immunoprécipitation. J'ai montré qu'un anticorps commercial (Abgène, AP20380b) est efficace pour des expériences d'immunoprécipitation mais cela rendrait nos expériences trop onéreuses. Afin de pallier ce manque, une étudiante de l'équipe a édité le génome des cellules HeLa par la méthode CRISPR/Cas9 pour fusionner une étiquette Flag à la protéine endogène CWC27. Les deux allèles du gène CWC27 ayant été modifiés, la totalité des protéines CWC27 produites dans cette lignée sont étiquetées et la protéine CWC27 peut alors être précipitée à l'aide d'anticorps anti-Flag.

1.2 Lyse cellulaire

Une majorité des protéines que nous étudions sont des protéines nucléaires. Notre premier objectif va être d'utiliser différentes conditions de lyse des cellules humaines pour solubiliser les protéines d'intérêts tout en préservant les complexes natifs. J'ai testé, dans un premier temps, une lyse avec les deux tampons différents suivants :

- Le **tampon RIPA** (Radio immunoprécipitation assay) contient des sels (NaCl à 150mM) et deux détergents permettant de solubiliser des protéines du cytoplasme. Le deoxycholate (1%) est un détergent ionique, qui est utilisé pour dissoudre les membranes et le NP-40 (Nonylphenylpolyethylene glycol, 1%) qui est un

détergent non ionique, considéré comme surfactant doux car il dissout les interactions lipide-lipide et lipide-protéine mais pas les interactions protéine-protéine.

- Le **tampon HKM** est plus doux et contient des sels (NaCl à 300mM) pour déstabiliser les interactions protéine-protéine et du NP-40 (0,5%) afin de déstabiliser la membrane cytoplasmique.

Une fois lysées dans ces tampons, les cellules sont centrifugées à haute vitesse pour fractionner le lysat en deux : une fraction contenant les débris cellulaires, la fraction « non-soluble ou culot » (C) et une fraction « soluble » (S). L'analyse de ces fractions par western blot est présentée en **Figure 11**. Nous remarquons que les trois protéines (CWC22, CWC27 et eIF4A3) ne sont pas extraites avec la même efficacité puisque les protéines CWC22 et CWC27 sont majoritairement présentes dans la fraction soluble (S) contrairement à eIF4A3, dont 50% restent dans le culot (C).

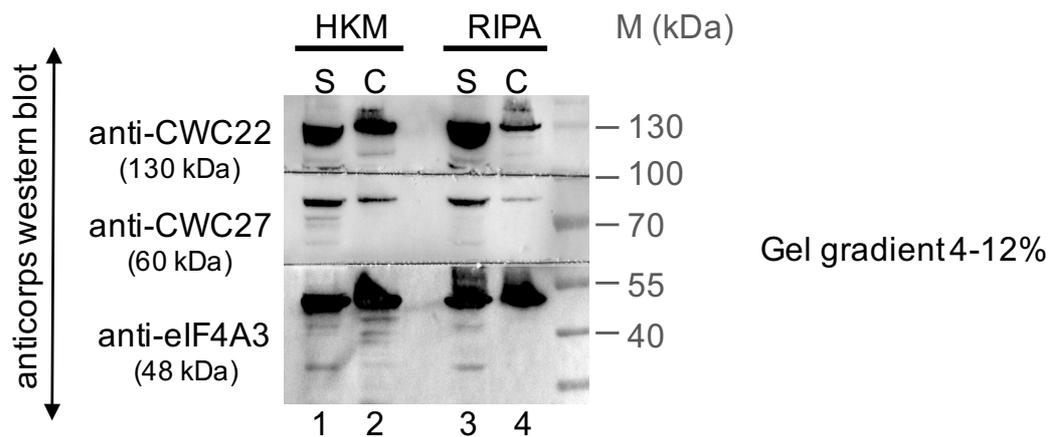


Figure 11: Analyse par western blot des lysats cellulaires obtenus à l'aide des tampons HKM et RIPA. Les anticorps utilisés sont indiqués à gauche. M : pour marqueur de tailles en kDa.

1.3 Lyse cellulaire avec sonication

L'excision des introns par la machinerie d'épissage a lieu majoritairement de manière co-transcriptionnelle. De nombreux facteurs d'épissage sont fortement

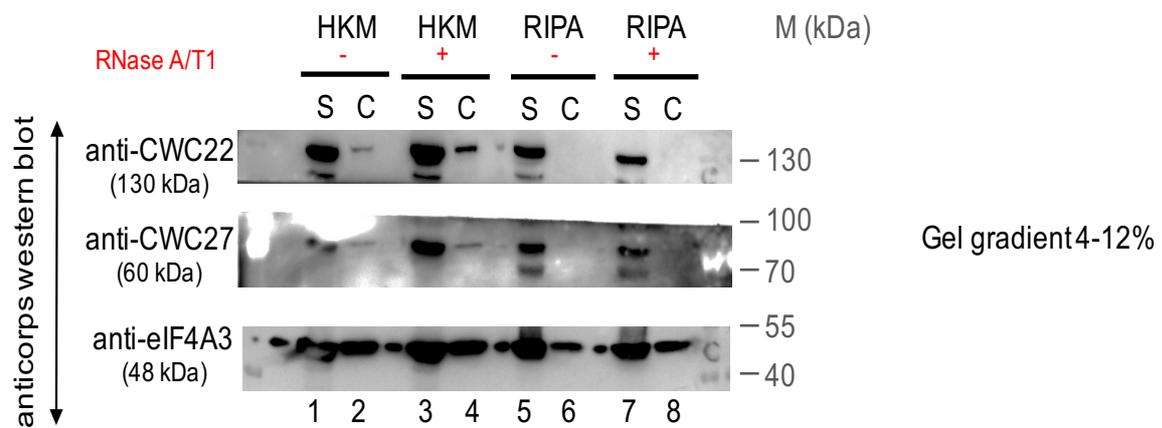


Figure 12 : Analyse par western blot des lysats après traitement RNase. Les anticorps utilisés sont indiqués à gauche. M : pour marqueur de tailles en kDa.

associés à la chromatine qui se retrouve principalement dans la fraction non-soluble. Pour tenter de mieux solubiliser les facteurs d'épissage, j'ai choisi d'ajouter une étape de sonication après la lyse cellulaire dans le but d'augmenter la proportion de protéines solubles. Cette étape se fait après l'homogénéisation des cellules dans le tampon de lyse pour casser la chromatine ou les complexes liés lors du début de la transcription par des ondes sonores à haute fréquence. Dans ces conditions, nous observons une solubilisation quasi totale des protéines dans le surnageant en comparaison au culot (**Figure 12**). En revanche, pour la protéine eIF4A3, une proportion importante reste dans le culot.

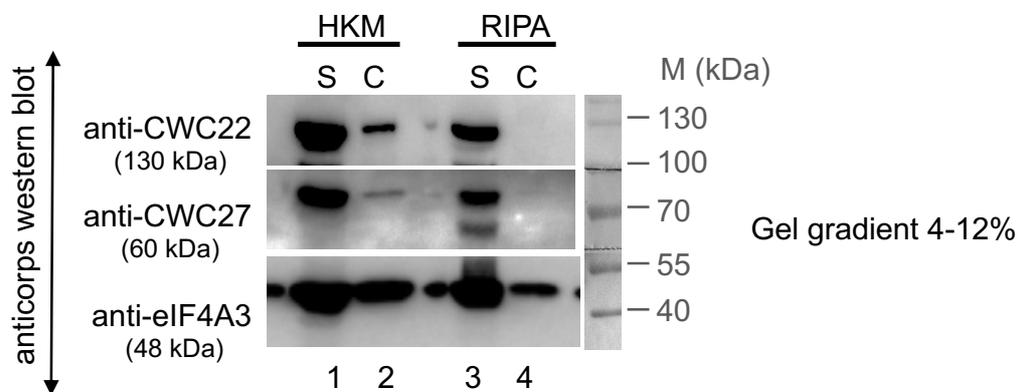


Figure 13 : Analyse par western blot des lysats après sonication. Les lysats cellulaires sont obtenus à l'aide des tampons HKM et RIPA. Les anticorps utilisés sont indiqués à gauche. M : pour marqueur de tailles en kDa.

1.4 Effet du traitement RNase sur la lyse cellulaire

De nombreuses protéines telles que les RBP s'associent par le biais de l'ARN. Il ne s'agit donc pas toujours d'association directe entre partenaires protéiques. Pour augmenter la solubilisation de ces protéines dans le lysat, et ne tenir compte que d'interactions spécifiques entre protéines (i.e. non médiées par la présence d'ARN) j'ai également testé l'effet d'un traitement avec les RNases A et de RNases T1 avant la sonication. La RNase A hydrolyse spécifiquement l'ARN après les résidus Cytosine (C) et Uracile (U) alors que la RNase T, hydrolyse spécifiquement l'ARN après les résidus Guanosine (G). Ce mélange de nucléases permet une digestion efficace des ARN. Les résultats obtenus par western blot indiquent que le traitement par les RNases durant la lyse cellulaire ne semble pas améliorer la solubilisation de la protéine eIF4A3. (**Figure 13**).

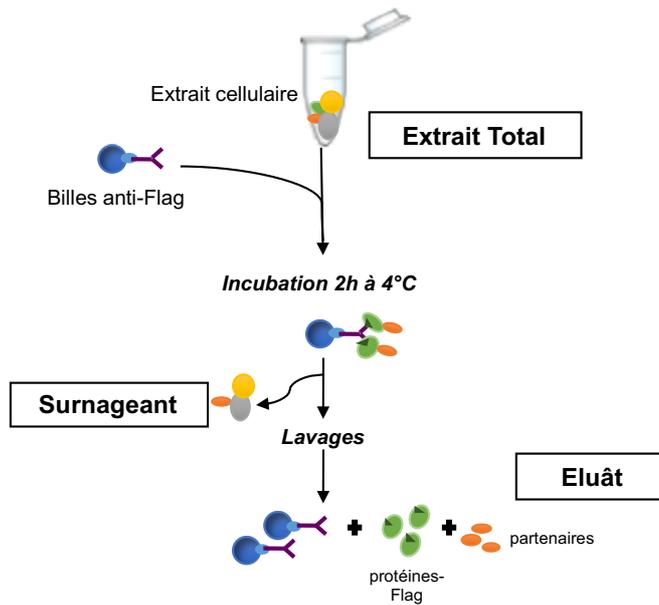


Figure 14 : Principe de l'immunoprécipitation (IP).

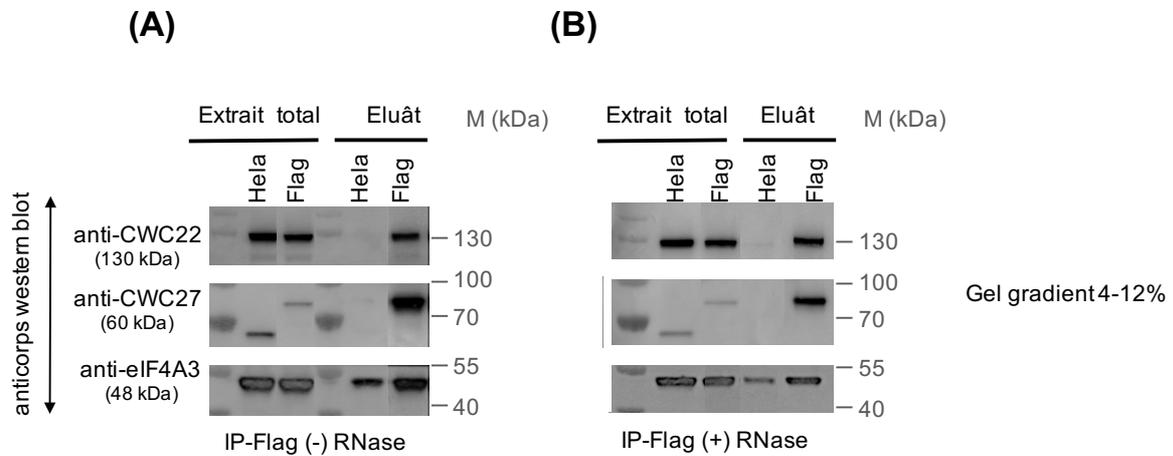


Figure 15 : Western blot des éluâts obtenus après immunoprécipitation de Flag-CWC27.

Test d'immunoprécipitation après lyse en présence du tampon HKM, de cellules humaines HeLa (contrôle négatif) et de cellules exprimant la protéine Flag-CWC27 après traitement (A) en absence (B) ou en présence de RNases. L'extrait total (1/20) et l'éluât (dépôt de la totalité de l'éluat) ont été analysés sur gel SDS-PAGE et les protéines ont été révélées par western blot avec les anticorps anti-CWC22, anti-CWC27 et anti-eIF4AIII.

Ces différentes expériences montrent donc que le tampon HKM (tampon plus doux) associé à une étape de sonication présente quasiment les mêmes caractéristiques de solubilisation que le tampon RIPA (plus dénaturant) pour les protéines CWC22, CWC27 et eIF4A3. Mon objectif étant d'extraire des complexes dans une conformation native, j'ai choisi de privilégier les conditions douces en tampon HKM, avec et sans traitement RNase suivi d'une étape de sonication pour la suite de mes expériences.

2. CARACTERISATION DES PARTENAIRES DE CWC27

2.1 Mise au point de l'immunoprécipitation

2.1.1 Immunoprécipitation classique

Dans le cadre de mon étude, l'expérience d'immunoprécipitation (**Figure 14**) consistait à incuber les lysats cellulaires de cellules HeLa exprimant la protéine Flag-CWC27 avec des billes magnétiques associées à des anticorps anti-Flag (nommées billes Flag).

Après l'incubation de l'extrait cellulaire avec les billes Flag, des lavages sont effectués afin d'éliminer le maximum de protéines non spécifiques et pour ne retenir que le complexe protéique lié à CWC27. Les protéines retenues sont ensuite éluées des billes à l'aide d'une solution contenant du SDS puis séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE et révélées par Western blot. En parallèle, un contrôle négatif est réalisé. Pour cela la même expérience est réalisée mais le lysat cellulaire est issu de cellules de la lignée parentale HeLa exprimant la protéine CWC27 sans l'étiquette Flag. La comparaison des éluâts permet ainsi de vérifier si les protéines détectées se fixent spécifiquement ou non aux billes Flag. Les différentes étapes de l'immunoprécipitation (quantité de cellules, temps d'incubation, lavages et température) sont extrêmement précises pour optimiser la reproductibilité des expériences. (**Figure 15**).

Les résultats obtenus montrent que la protéine Flag-CWC27 est précipitée spécifiquement à partir de la lignée HeLa Flag-CWC27 mais pas à partir de la lignée parentale. Le traitement par les RNases n'affecte pas l'efficacité de précipitation.

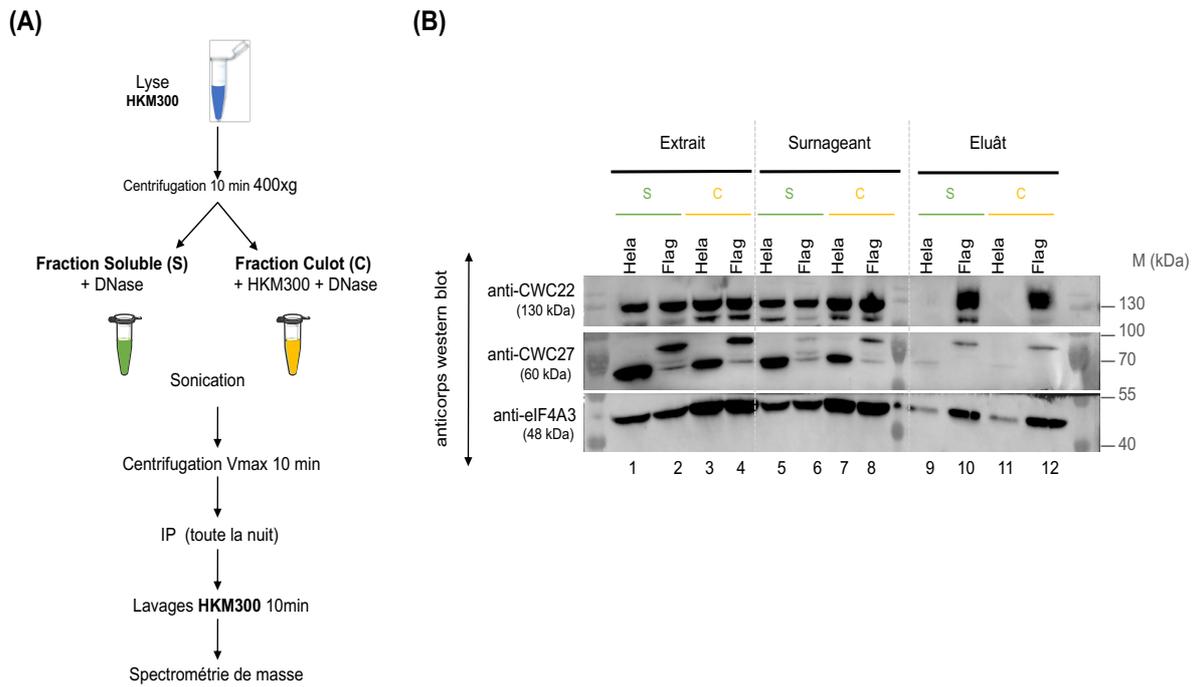


Figure 16 : Schéma représentatif de l'IP et résultat du western blot de l'IP.

(A) Schéma de la stratégie de l'IP. (B) Test d'immunoprécipitation après lyse cellulaire des cellules humaines HeLa (contrôle négatif) et de cellules Flag-CWC27 en présence du tampon HKM. L'extrait total (1/20) et l'éluât (dépôt de l'éluât total) ont été analysés sur gel SDS-PAGE et les protéines révélées par western blot avec les anticorps dirigés contre les protéines CWC22, CWC27 et eIF4AIII. Identification des partenaires de CWC27 est ensuite effectuée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Dans ces conditions, les protéines CWC22 et eIF4A3 sont efficacement co-précipitées dans les deux conditions. Par contre, nous observons que contrairement à CWC22 et CWC27, eIF4A3 se fixe de façon non spécifique aux billes Flag. Nous pouvons donc conclure que CWC27 est associée avec CWC22 et eIF4A3 et que ces interactions ne sont probablement pas médiées par l'ARN.

2.1.2 Immunoprécipitation en conditions stringentes

Afin de réduire l'interaction non-spécifique d'eIF4A3 aux billes Flag, plusieurs paramètres lors de l'immunoprécipitation ont été modifiés tels que le fractionnement cellulaire, le temps d'incubation sur les billes ainsi que les conditions de lavage (durée et concentration en sel plus élevées). Les deux fractions obtenues après centrifugation, culot et soluble, ont été analysées, (**Figure 16 A**). Dans ces nouvelles conditions plus stringentes, nous observons une baisse de la quantité d'eIF4A3 retenue (piste 9 et 11 **Figure 16 B**) sur les billes Flag alors que les protéines CWC27 et CWC22 restent toujours éluées dans les mêmes proportions (piste 10 et 12 **Figure 16 B**). Par la suite, ces conditions opératoires seront retenues pour immunoprécipiter la protéine Flag-CWC27.

Nos expériences d'immunoprécipitation ont mis en évidence l'association des protéines CWC27, CWC22 et eIF4A3. Pour caractériser la présence d'autres candidats dans ce complexe, nous avons couplé l'immunoprécipitation à une analyse par spectrométrie de masse. Celle-ci a été réalisée par la plateforme « Protéomique/Spectrométrie de Masse » de l'Institut Jacques-Monod.

2.1.3 Principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation dans un champ électrique de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Dans notre cas, nos échantillons ont été analysés par un système LC-MS/MS qui est constitué de deux composants : un appareil de chromatographie liquide et un spectromètre de masse. Les échantillons sont d'abord digérés par la trypsine pour obtenir un mélange de peptides (étape de préparation de l'échantillon). Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lys, Arg) engage sa fonction acide. Le mélange peptidique est soumis à une séparation par chromatographie liquide (LC) où les peptides sont séparés sur une colonne apolaire (étape de fractionnement). Au cours de leur élution, les peptides sont transmis vers la source du spectromètre de masse. Le spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation qui ionise et vaporise les composés, d'une combinaison d'analyseurs (analyse MS/MS) et d'un système de traitement du signal. (Figure17).

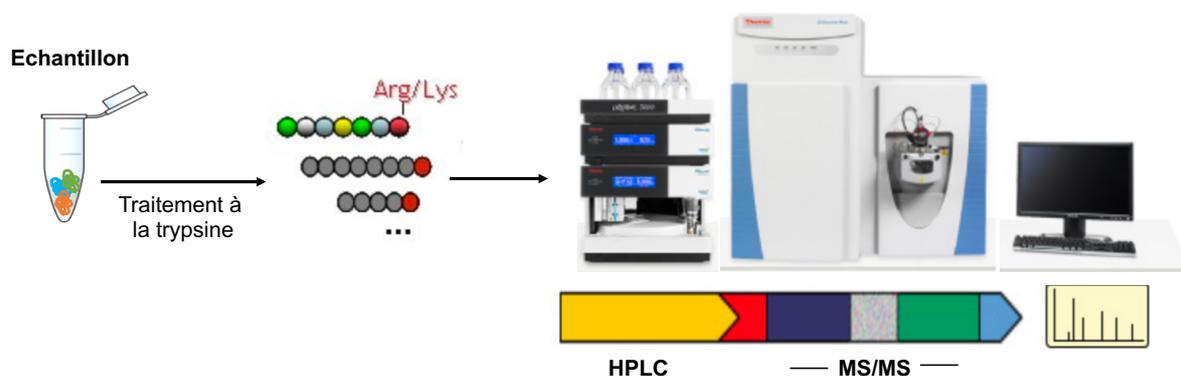
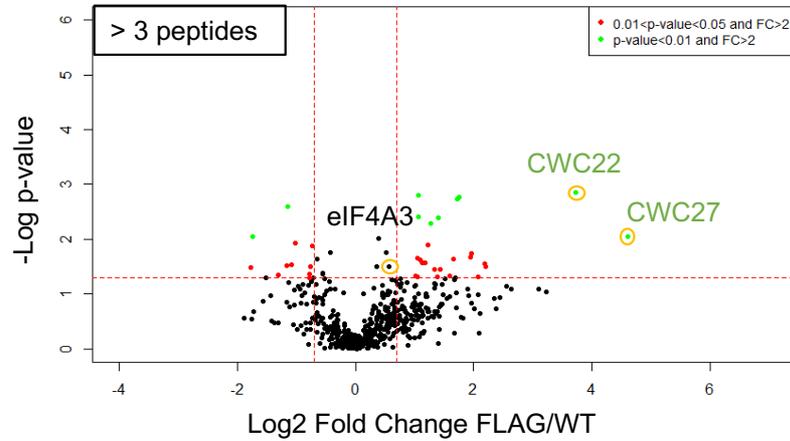


Figure 17 : Schéma simplifié de l'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

2.1.4 Analyse des résultats de spectrométrie de masse

Pour cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire Flag-CWC27, effectué la lyse dans un tampon HKM300 sans traitement RNase, puis séparé les fractions solubles (fraction « soluble ») et non-solubles (fraction « culot ») par centrifugation à haute vitesse avant l'étape d'immunoprécipitation à l'aide de billes Flag comme décrit précédemment (2.1.2) effectuée sur les deux fractions (**Figure 16A**). La même expérience a été réalisée en parallèle à partir de cellules HeLa exprimant la protéine CWC27 sans étiquette. Cette expérience sert de contrôle négatif important pour déterminer les interactions non-spécifiques. Étant donné la sensibilité de la spectrométrie de masse, ce contrôle négatif est particulièrement important pour

(A) Fraction Culot



(B) Fraction Soluble

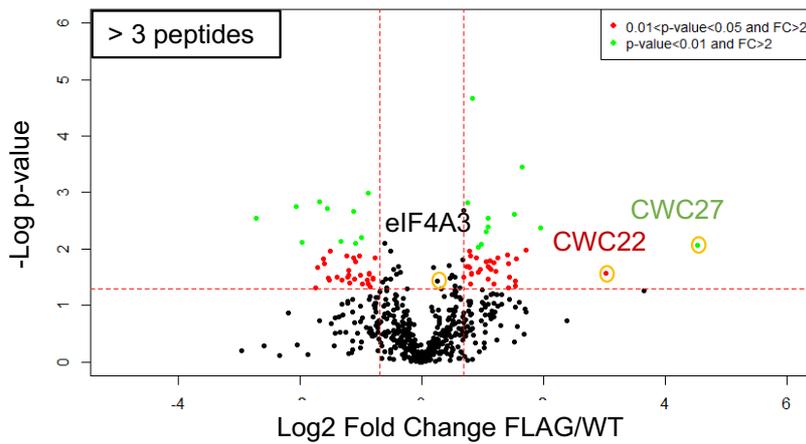


Figure 18: Résultats de la spectrométrie de masse sous forme de graphiques Volcano plot.

(A) Résultats de la spectrométrie de masse avec la fraction Soluble. **(B)** Résultats de la spectrométrie de masse avec la fraction Culot.

L'axe des ordonnées correspond à la valeur d'expression moyenne de log 10 (valeur p), et l'axe des abscisses affiche la valeur de changement de log₂ (FC). Les lignes verticales et horizontales rouges reflètent les critères de filtrage (FC = ± 2.0 et 0,01 < p < 0,05). Les points rouges représentent les peptides dont la p-value est comprise entre 0,01 < p-value < 0,05 et FC > 2 ; les points verts représentent les peptides dont la p-value < 0,01 et un FC > 2 et les points noirs représentent le reste des autres peptides.

quantifier l'abondance des protéines détectées. Afin d'obtenir des résultats quantitatifs et statistiquement significatifs, il est également nécessaire de réaliser plusieurs répliques. Nous avons donc effectué pour l'analyse des deux lignées cellulaires, 3 répliques de la fraction « soluble » et 3 répliques de la fraction « non-soluble ». Au total, 12 échantillons ont donc été analysés.

Les résultats de cette étude sont représentés dans la **Figure 18** sous forme d'un graphique de type « volcano ». Sur ce type de graphique, chaque protéine détectée est représentée par un point dont les coordonnées correspondent : en abscisse, au taux d'enrichissement de la protéine par rapport à la quantité détectée dans le contrôle négatif et en ordonnée, par la significativité statistique basée sur l'analyse des 3 répliques. Si l'abondance d'une protéine est élevée dans un réplica mais très faible dans les autres réplicas, alors la valeur statistique de ce résultat (p value) sera faible. Au contraire, si une protéine est présente dans les trois réplicas en abondance similaire, la valeur statistique sera élevée. En plus de ces valeurs, il est important de considérer le nombre de peptides représentant une protéine. Plus une protéine est représentée par un grand nombre de peptides détectés de manière significative plus cette protéine sera une candidate sérieuse. Ces comparaisons sont nécessaires car les analyses par spectrométrie de masse sont très sensibles et conduisent à une très longue liste de protéines détectées. Pour être sélectif, nous avons choisi de considérer uniquement les protéines pour lesquelles au moins 3 peptides sont détectés (**Figure 18**).

Comme attendu, la protéine CWC27 est la protéine la plus abondante dans les éluats. Cette analyse confirme aussi la présence majoritaire de CWC22 et donc la forte stabilité d'un complexe CWC22/CWC27 *in vivo* dans les deux fractions. Par contre, de manière plus inattendue, eIF4A3 n'est pas très significativement enrichie. Cela s'explique en partie par sa présence dans le contrôle négatif due à son interaction aspécifique avec les billes Flag (**Figure 16B**). Malgré la stringence des lavages lors de l'immunoprécipitation, les interactions non-spécifiques d'eIF4A3 dans le contrôle négatif ne sont absolument pas négligeables, d'autant plus que l'analyse par spectrométrie de masse est bien plus sensible que la technique de western-blot.

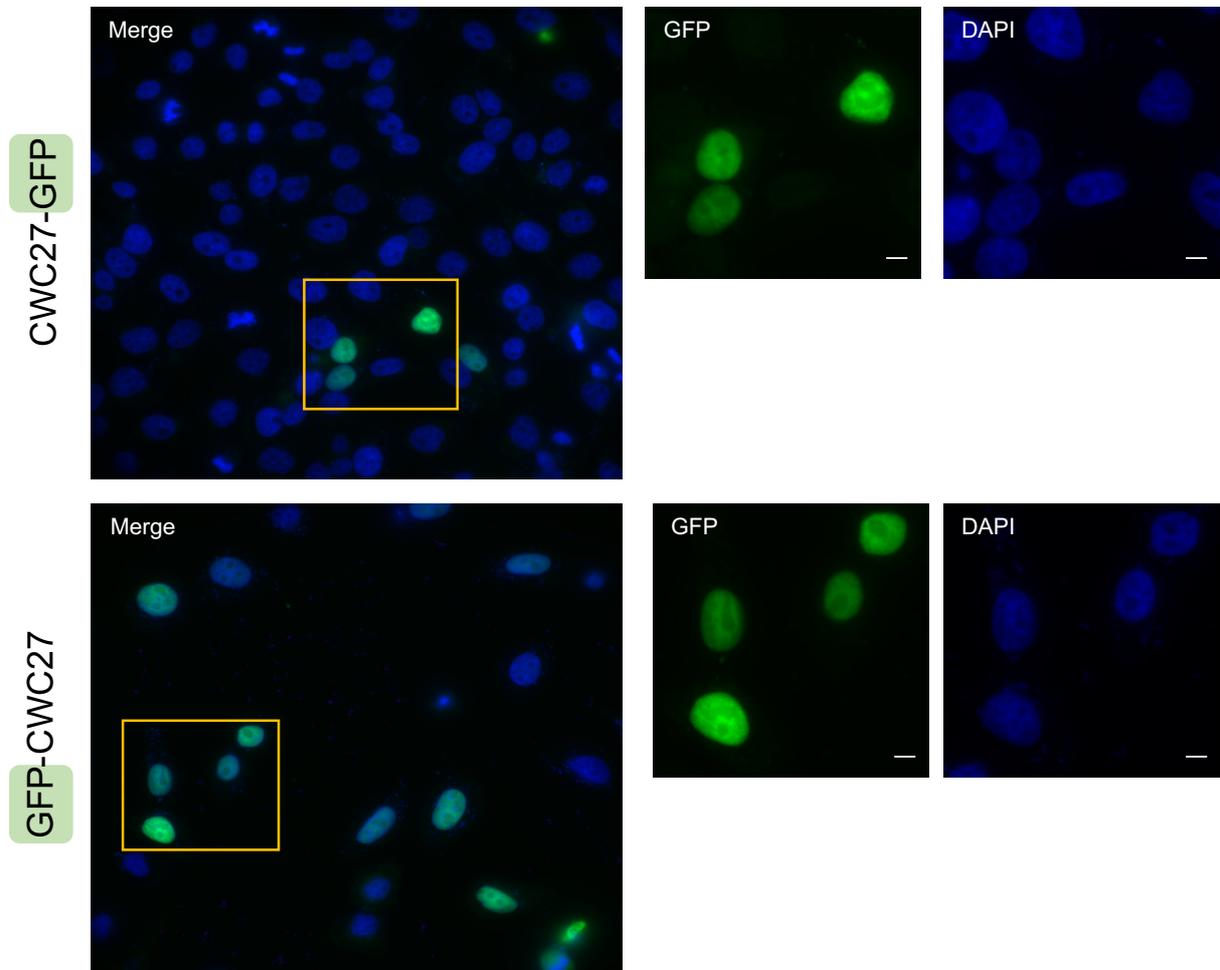


Figure 19: Localisation cellulaire de CWC27 fusionnée avec la GFP.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec CWC27-GFP (images du haut) ou GFP-CWC27 (images du bas) et colorées au DAPI pour révéler le noyau (bleu). Les deux grands panneaux de gauche (Merge) montrent la superposition du signal GFP (vert) avec le signal DAPI (bleu). Les deux panneaux de droite (GFP et DAPI) représentent un agrandissement du carré jaune situé sur l'image Merge. Barres d'échelle en μm . Objectif X100.

3. LOCALISATION DE CWC27

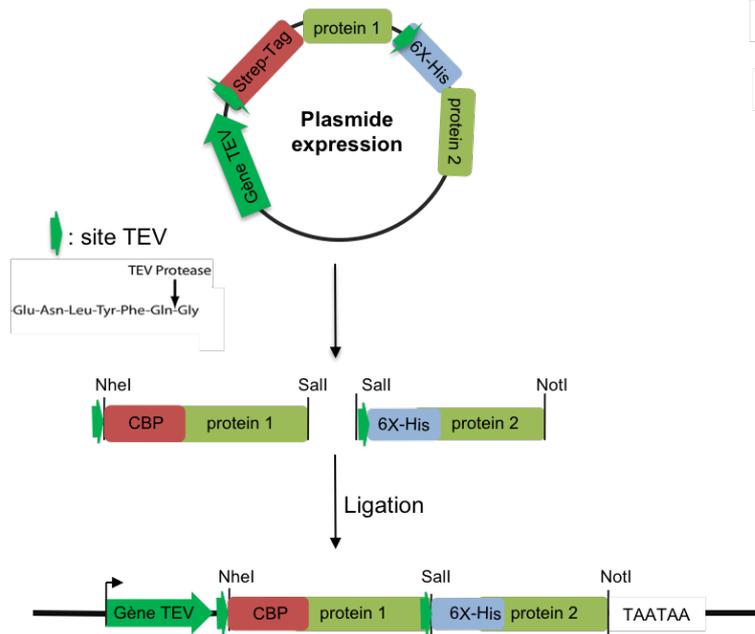
Afin de mieux caractériser la protéine CWC27, j'ai ensuite utilisé une méthode d'imagerie cellulaire, la microscopie à fluorescence pour déterminer la localisation de cette protéine dans les cellules humaines. Ce type d'approche permet de déterminer si des protéines sont localisées dans les mêmes compartiments cellulaires.

Pour visualiser CWC27, nous avons fusionné la protéine au rapporteur fluorescent GFP (« Green Fluorescent Protein »). La fusion d'une étiquette à une extrémité d'une protéine peut parfois modifier le repliement, la localisation ou la fonction de la protéine. C'est pourquoi, la fusion du rapporteur GFP a été réalisée soit à l'extrémité N-terminale soit à l'extrémité C-terminale de la protéine CWC27 (**Figure 19**). Les images obtenues montrent que CWC27 est localisée exclusivement dans le noyau (**Figure 19**) comme nous l'avons précédemment observé pour la protéine CWC22 (Barbosa et al., 2012).

4. INTERACTION *IN VITRO*

L'objectif de seconde partie de mon projet a été de caractériser *in vitro* le complexe formé par les protéines CWC27, CWC22 et eIF4A3. Les expériences d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse quantitative, ayant permis de renforcer l'hypothèse d'un dimère CWC27/CWC22. Toutefois, la purification de ce complexe à partir de lysats cellulaires n'exclut nullement la présence d'autres partenaires nécessaires à l'intégrité de ce complexe (protéines, ARN,...). Une manière simple de comprendre l'organisation d'un complexe protéique consiste à tenter de reconstituer ce complexe à l'aide de protéines recombinantes *in vitro*. Cette approche minimaliste peut être très utile pour déterminer si des protéines interagissent directement entre elles et pour identifier précisément les domaines d'interaction. J'ai notamment utilisé cette approche pour caractériser le complexe dimérique CWC22-eIF4A3 (Barbosa et al., 2012). Pour ce faire, la première étape de cette approche consiste en l'expression et la purification de chacun des constituants sous forme recombinante. Au laboratoire, nous privilégions un système d'expression bactérien qui est plus simple à mettre en œuvre que les systèmes d'expression dans des cellules d'insecte ou des cellules humaines.

(A)



(B)

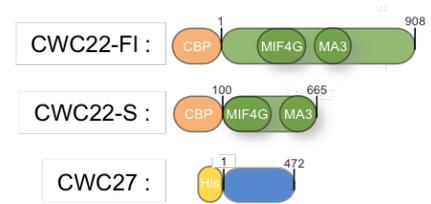


Figure 20 : Méthodologie de la co-expression de CWC22/CWC27.

(A) Schéma de la méthodologie (B) Représentation de CWC22 forme longue (FI), CWC22 forme courte (S) et CWC27 sous forme recombinante dans la bactérie *E. coli*.

Cependant ce système d'expression bactérien présente des désavantages comme celui de ne pas intégrer les modifications post-traductionnelles qui sont parfois essentielles pour la stabilité et/ou la fonction des protéines eucaryotes.

4.1 Reconstitution du dimère CWC22/CWC27

Ayant déjà exprimé les protéines de l'EJC et CWC22 par le passé, la première étape fut d'exprimer la protéine CWC27. Lors des premières tentatives d'expression et de purification d'une protéine recombinante nous ajoutons à l'extrémité N-terminale et/ou C-terminale de la protéine une étiquette CBP (Calmoduline Binding Peptide) ou histidine. Après transformation du plasmide d'expression dans la bactérie *E.coli*, culture et induction de l'expression du gène recombinant, le lysat bactérien est soumis à deux étapes de purification : (i) la première sur une résine de nickel pour retenir les protéines fusionnées à l'étiquette His puis sur une résine de calmoduline pour purifier les protéines liées à l'étiquette CBP. Cette méthode permet de purifier les protéines de taille complète et de réduire la purification des éventuels produits de dégradation (Fiorini et al., 2012) .

Par cette approche, j'ai tenté de purifier le domaine conservé de CWC27 correspondant au domaine PPIase. Cependant, la protéine correspondante produite chez la bactérie est très instable en solution et précipite très rapidement après purification. J'ai donc tenté de produire d'autres forme de la protéine CWC27, l'une plus longue que le domaine PPIase de la protéine (aa 1-390), correspondant à une des isoformes de CWC27 produite par épissage alternatif et l'autre, légèrement plus courte que la protéine complète (1-472 aa). Malheureusement, ces protéines sont peu ou pas exprimées par ce système d'expression.

Par le passé, nous avons remarqué au laboratoire que certaines protéines comme Magoh et Y14 (Ballut et al., 2005), Upf2 et Upf3b (Chamieh et al., 2008) ou CWC22 et eIF4A3 (Barbosa et al., 2012) sont bien plus stables lorsqu'elles sont co-exprimées dans la bactérie avec leur partenaire protéique. J'ai donc tenté de co-exprimer les protéines CWC27 et CWC22 à l'aide d'une nouvelle méthodologie pour la production des protéines instables ((Levy et al., 2016); **Figure 20**).

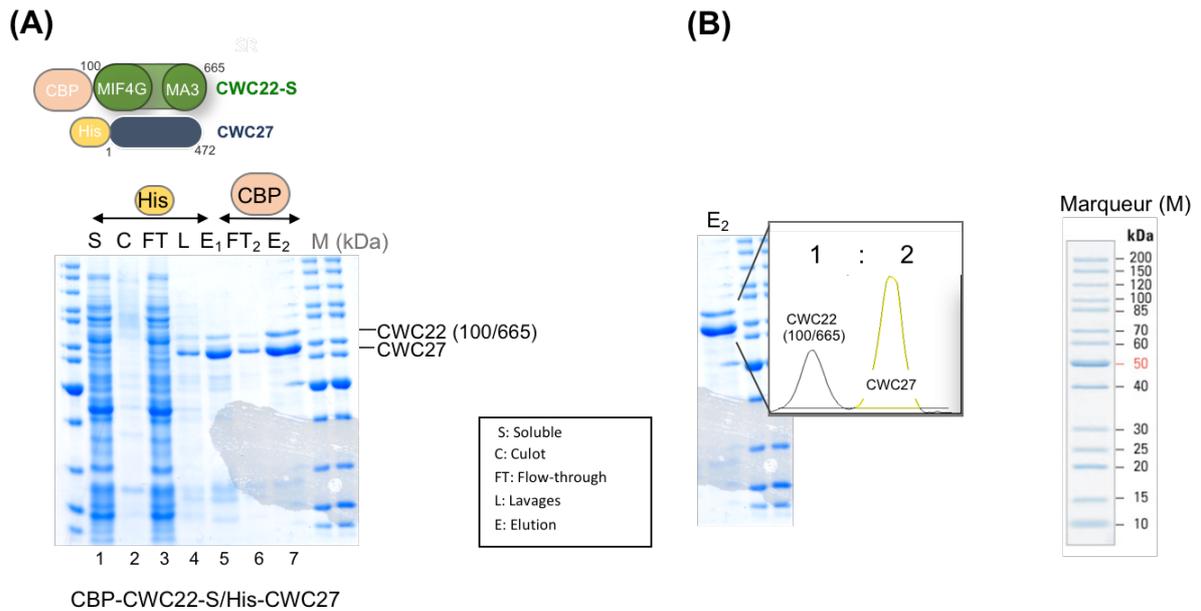


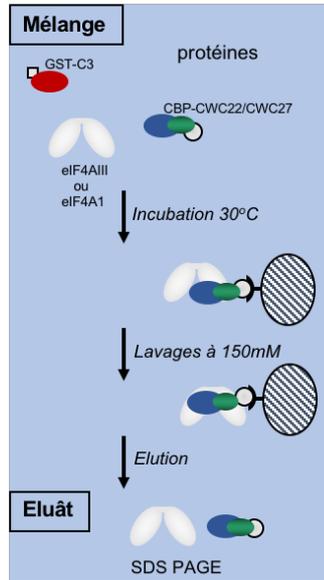
Figure 21 : Co-expression bactérienne de l'hétérodimère CWC22/CWC27.

(A) Purification du dimère CWC27/CWC22-S. Visualisation directe par coloration au bleu de coomassie des protéines recombinantes purifiées sur gel SDS-PAGE 4-12%. **(B)** Quantification par le logiciel ImageJ du dimère CWC27/CWC22-S. M : marqueur de taille.

Cette méthodologie repose sur l'expression de plusieurs protéines à partir d'un seul promoteur et d'un seul transcrit à la manière d'un opéron chez la bactérie. La première protéine exprimée est la protéase TEV qui reconnaît un site spécifique pour cliver les protéines (**Figure 20A**). Les protéines suivantes sont les protéines d'intérêt, dans notre cas CWC22 et CWC27. Toutes les protéines sont séparées par un site de clivage par la TEV. La présence de la protéase TEV permet de cliver les protéines directement dans la bactérie. Les protéines ont ainsi la possibilité d'interagir ensemble dès leur synthèse et de se stabiliser mutuellement. Deux formes de CWC22 ont été utilisées pour former le complexe avec CWC27. Une forme longue de CWC22 nommée CWC22-FL (1-908) et une forme courte nommée CWC22-S (100-665). Une étiquette CBP a été ajoutée à leur extrémité N-terminale des protéines CWC22 et une étiquette hexa-histidine (His) à la protéine CWC27. Les complexes ont été exprimés dans la bactérie *E. coli* et les lysats bactériens ont été purifiés d'abord par une colonne d'affinité de nickel puis par une colonne de calmoduline. Les fractions obtenues consécutivement aux deux purifications successives sont analysées sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 21**).

La co-expression de l'hétérodimère CWC27/CWC22-S est la seule à avoir fonctionné. Sur la **Figure 21 (A)**, on observe les dépôts des différentes étapes de la purification. Cet hétérodimère a été purifié à l'aide des deux étiquettes. D'abord sur une colonne d'affinité portant des résidus de Nickel pour les retenir par leur étiquette hexa-histidines (pistes 1 à 5), puis sur une résine de calmoduline pour les retenir par leur étiquette CBP (piste 6 et 7). La piste 5 est l'étape d'élution, dernière étape de la première purification, contenant la protéine recombinante CWC27 porteuse de l'étiquette Histidine qui s'est bien accrochée aux billes Nickel, après plusieurs lavages. Pour éliminer les protéines aspécifiques restantes et confirmer la présence de ce dimère, la deuxième purification est effectuée sur des billes calmoduline, ou la fixation se fait alors par la protéine recombinante CWC22. La piste 7, représentant l'élution de la colonne calmoduline, montre la présence des deux protéines recombinantes purifiées aux tailles attendues : CWC22-S/CWC27.

(A)



(B)

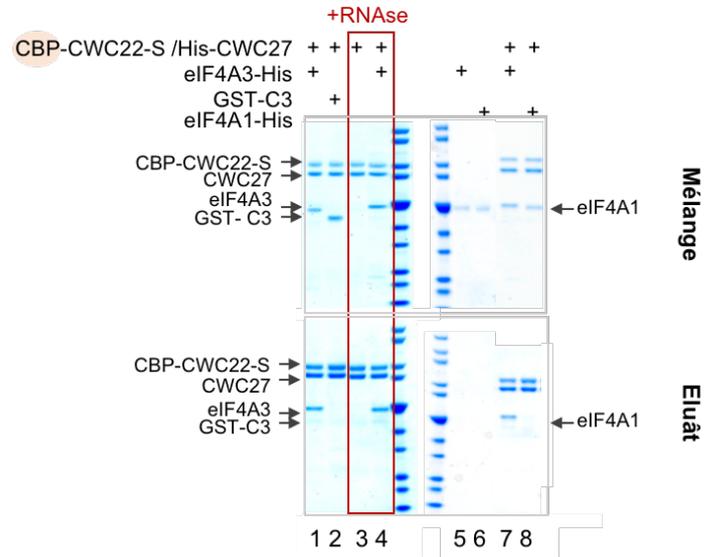


Figure 22 : Principe des interactions in vitro et résultats du dimère avec eIF4A3.

(A) Schéma du principe des interactions *in vitro* entre la protéine eIF4A3 (en blanc) et le complexe CWC22/CWC27 (vert/bleu). (B) Résultat des interactions de eIF4A3 avec CWC27/CWC22, sur gel SDS-PAGE 4-12% coloré au bleu de Coomassie. En haut, le gel représentant le mélange initial de protéines et en bas, dépôt de l'éluât (protéines retenues).

Lorsqu'on analyse ce dimère **Figure 21 (B)** à l'aide d'un logiciel de quantification ImageJ, on montre que pour une protéine recombinante CWC22-S on a deux protéines recombinantes CWC27. Ce dimère ne semble donc pas être stœchiométrique.

4.2 Interaction spécifique d'eIF4A3 avec le dimère CWC27/CWC22

La purification du dimère CWC22/CWC27 effectuée, j'ai ensuite entrepris de tester l'interaction *in vitro* entre le dimère CWC22/CWC27 et la protéine eIF4A3. Brièvement, le dimère présentant une étiquette CBP est mélangé avec la protéine recombinante eIF4A3, le premier servant d'appât et le deuxième de partenaire potentiel. Après plusieurs lavages dans un tampon contenant 150mM de sels, les protéines sont éluées par dénaturation et déposées sur gel SDS-PAGE dont la révélation s'effectue après coloration au bleu de Coomassie (**Figure 22A**)

Dans ces conditions, j'ai pu montrer que la protéine eIF4A3 est efficacement co-précipitée par le dimère CWC22/CWC27 (pistes 1 et 7). Plusieurs contrôles négatifs permettent de vérifier que l'interaction entre la protéine eIF4A3 et le dimère CWC22/CWC27 est bien spécifique. Ainsi, en absence de du dimère CBP-CWC22/CWC27, eIF4A3 n'est pas précipitée (piste 5). D'autre part, ni la protéase C3 (piste 2), ni l'ARN hélicase eIF4A1 (piste 8) qui présentent 65% de similarité de séquence avec la protéine eIF4A3 ne sont précipitées par le dimère CBP-CWC22/CWC27 dans les mêmes conditions.

Enfin, l'interaction entre eIF4A3 et le dimère CWC22/CWC27 (piste 4) n'est pas indirectement médiée par la présence de molécules d'ARN car l'incubation du mélange protéique en présence de RNases n'affecte pas l'interaction (piste 4).

4.3 Contrôles avec la protéine CWC22-S et eIF4A3

Au laboratoire, nous avons préalablement montré que la protéine CWC22 interagit directement avec la protéine eIF4A3 (Barbosa et al., 2012). Bien que spécifique, elle n'est pas très stable et ne résiste pas aux conditions stringentes des lavages. Pour déterminer si CWC27 contribue à stabiliser l'interaction avec eIF4A3, nous avons comparé l'efficacité de précipitation d'eIF4A3 par CBP-CWC22 et par

CBP-CWC22/CWC27 et ceci dans deux conditions de lavages qui varient par la concentration en NaCl (**Figure 23**).

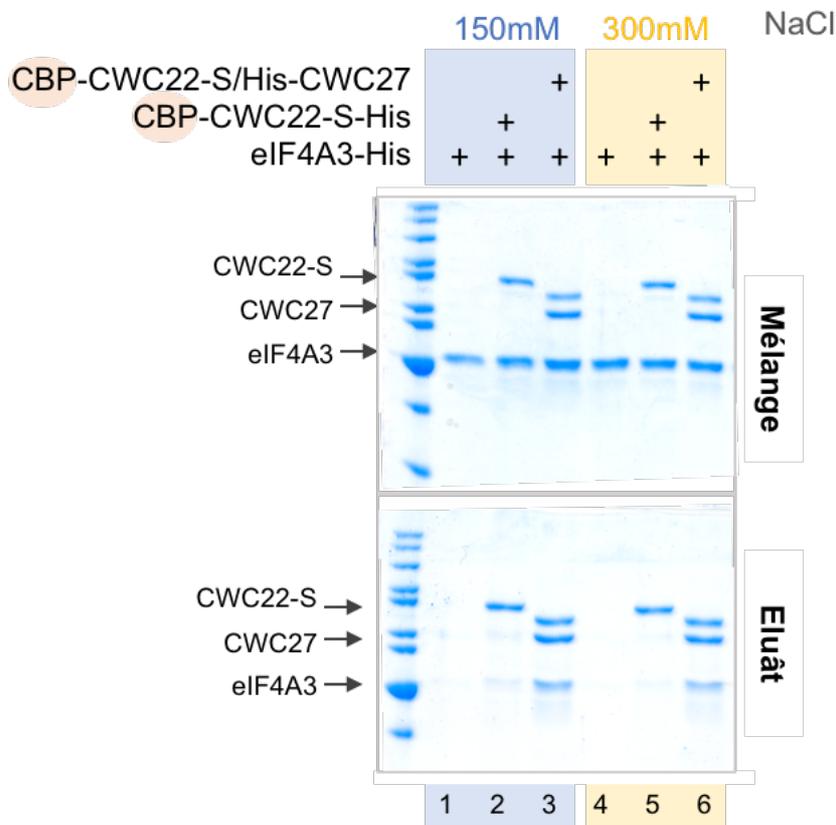


Figure 23 : Résultats des interactions in vitro après lavages à 150mM et 300mM NaCl.

Résultat des interactions de eIF4A3 avec CWC27/CWC22 ou CWC22-S (forme courte) après des lavages à différentes concentrations salines (150mM ou 300mM NaCl). Les éluâts sont déposés sur gel SDS-PAGE 4-12% puis le gel est coloré au bleu de Coomassie. En haut, le gel représentant le mélange initial de protéines et en bas, dépôt de l'éluât (protéines retenues).

Les pistes 1 et 4 sont des contrôles négatifs montrant qu'eIF4A3 n'est pas retenue sur les billes de manière non-spécifique. Nous observons qu'eIF4A3 est légèrement précipitée par CBP-CWC22 (pistes 2 et 5). Par contre dans les mêmes conditions, la protéine eIF4A3 est très efficacement précipitée par le dimère CBP-CWC22/CWC27 (pistes 3 et 6). Nous pouvons donc conclure que CWC27 stabilise l'interaction entre eIF4A3 et CWC22. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de savoir si la protéine CWC27 interagit directement avec la protéine eIF4A3 ou si la protéine CWC27 maintient la protéine CWC22 dans une conformation plus stable favorable à l'interaction avec eIF4A3.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV. CONCLUSION

Depuis plusieurs années, mon travail de recherche s'inscrit dans l'analyse du mécanisme d'assemblage du complexe EJC. Je me suis particulièrement intéressée aux étapes précoces de ce mécanisme et notamment le recrutement de l'ARN hélicase eIF4A3 par la machinerie d'épissage. Plus récemment, le but de mon travail a été de caractériser le pré-complexe potentiellement formé entre les protéines CWC22, CWC27 et eIF4A3. En effet, au laboratoire, des premiers résultats d'immunoprécipitation de CWC22 et d'eIF4A3 à partir de cellules humaines en culture suggéraient que la protéine CWC27 était un de leurs principaux partenaires. CWC27 est un facteur d'épissage dont la fonction précise n'a toujours pas été établie. De plus, des mutations de CWC27 sont associées à des maladies génétiques orphelines sévères et dont les symptômes sont proches d'autres maladies associées à des mutants de facteurs d'épissage et comme de nombreux facteurs d'épissage (Lehalle et al., 2015).

1. CWC22 ET CWC27 EXISTENT SOUS FORME D'UN HETEROMERE

Dans ce projet mon premier objectif fut d'optimiser les conditions d'extraction cellulaires et d'immunoprécipitation des partenaires de la protéine CWC27 afin de réaliser une analyse fine par spectrométrie de masse. J'ai distingué deux fractions cellulaires pour cette étude : l'une dite « soluble » contenant la majorité des constituants du nucléoplasme et du cytoplasme et l'autre dite « non-soluble » (fraction culot) correspondant aux protéines directement ou indirectement associées à la chromatine et aux machineries de transcription et de maturation des ARN pré-messagers. Dans les conditions d'immunoprécipitation choisies, le partenaire le plus abondant de la protéine CWC27 s'est avéré être la protéine CWC22. L'analyse des fractions par spectrométrie de masse a permis de détecter de nombreux autres facteurs et notamment des facteurs d'épissage mais dans des proportions bien inférieures. Le fait que les protéines CWC22 et CWC27 soient retrouvées conjointement dans la fraction soluble et que les deux protéines soient majoritairement localisées dans le noyau comme le montrent les expériences

d'immunofluorescence, cela suggère fortement que ces deux protéines existent sous forme d'un complexe, probablement un hétérodimère.

L'association d'eIF4A3 avec CWC22 et CWC27 est moins claire. En effet, la présence en quantité importante d'eIF4A3 dans l'immunoprécipitation contrôlée ne lui permet pas d'apparaître comme un des partenaires principaux de CWC27. Les résultats de spectrométrie de masse sont en accord avec nos résultats de western blot qui montrent qu'eIF4A3 reste en partie liée de manière non-spécifique sur les billes. Il est donc difficile à ce stade de dire si CWC22 et CWC27 sont associées à eIF4A3 dans la fraction soluble.

Pour préciser les interactions entre eIF4A3, CWC27 et CWC22, il serait intéressant de réaliser une double immunoprécipitation (ou immunoprécipitation en tandem) en immunoprécipitant successivement CWC27 puis CWC22, ou CWC27 puis eIF4A3 afin de détecter dans le lysat final le troisième partenaire. Ce type d'immunoprécipitation réduit considérablement la détection des interactions non-spécifiques. Cependant, l'efficacité d'élution de la première protéine précipitée dans des conditions natives et non dénaturantes est souvent faible et ne permet pas toujours d'obtenir des résultats clairs.

Des expériences de co-localisation cellulaire par immunofluorescence sont également envisagées et permettraient d'observer simultanément deux protéines du complexe à l'aide d'étiquettes fluorescentes distinctes (GFP et mCherry par exemple). Le mieux serait de combiner des anticorps d'origines différentes (lapin, souris,...) pour visualiser les protéines endogènes et non pas des protéines surexprimées. A l'heure actuelle, cette stratégie n'est cependant pas mise en œuvre car nous possédons au laboratoire majoritairement des anticorps polyclonaux produits chez le lapin et pas d'anticorps monoclonaux.

2. RECONSTITUTION DU COMPLEXE CWC22/CWC27/eIF4A3

Après avoir caractérisé le complexe CWC22/CWC27 par immunoprécipitation, j'ai tenté de reconstituer ce complexe à l'aide de protéines recombinantes. Cette approche complémentaire a permis dans le passé de mieux caractériser la structure

de plusieurs complexes : le cœur de l'EJC (Ballut et al., 2005), l'EJC lié aux facteurs de NMD (Chamieh et al., 2008), le complexe CWC22/eIF4A3 (Barbosa et al., 2012).

La protéine CWC27 est organisée en deux domaines, un domaine PPIase et une région non-structurée (Ulrich and Wahl, 2014). Suite à plusieurs essais infructueux de purification du domaine PPIase, j'ai décidé d'utiliser un nouveau système d'expression bactérien permettant de co-exprimer les protéines CWC22 et CWC27 à partir d'un même transcrit dans la bactérie. Cette méthode s'est révélée efficace pour permettre la production de complexes protéiques au sein de la bactérie chez *E.coli*, quand la production des protéines individuelles était difficile de par leur instabilité (Levy et al., 2016). L'application de cette méthode m'a permis non seulement de purifier la protéine CWC27 mais surtout de confirmer existence d'un dimère CWC22/CWC27 suffisamment stable pour résister à des lavages en présence de 300mM de NaCl. A lui seul, ce résultat m'a permis de confirmer l'existence d'une interaction directe entre ces deux protéines.

D'autre part la révélation du dimère CBP-CWC22/CWC27 sur gel SDS-PAGE après purification sur résine calmoduline, a permis de montrer que la bande correspondant à CWC27 était 2 fois plus intense que celle de CBP-CWC22. Ces données suggèrent donc qu'il y a un rapport 2 : 1 dans ce complexe, soit une protéine CWC22 pour deux protéines CWC27. Afin d'affiner ce résultat, il serait intéressant de faire une analyse par chromatographie d'exclusion en conditions natives afin de connaître la taille réelle de ce complexe et de vérifier la stoechiométrie d'assemblage. Actuellement, nous ne savons pas si ce rapport entre les deux protéines est identique *in vivo* ou si ce rapport résulte des conditions particulières liées à la production des protéines recombinantes.

Finalement, les tests d'interaction *in vitro* avec la protéine eIF4A3 montrent que le dimère CWC22/CWC27 offre un site de liaison bien plus stable que CWC22 seul. Malheureusement, les résultats ne nous permettent pas de préciser si eIF4A3 contacte les deux protéines ou seulement CWC22. Toutefois, ce résultat est complémentaire avec les analyses obtenues *in vivo* et laisse supposer que ces 3 protéines forment un complexe isolé ou au sein du spliceosome.

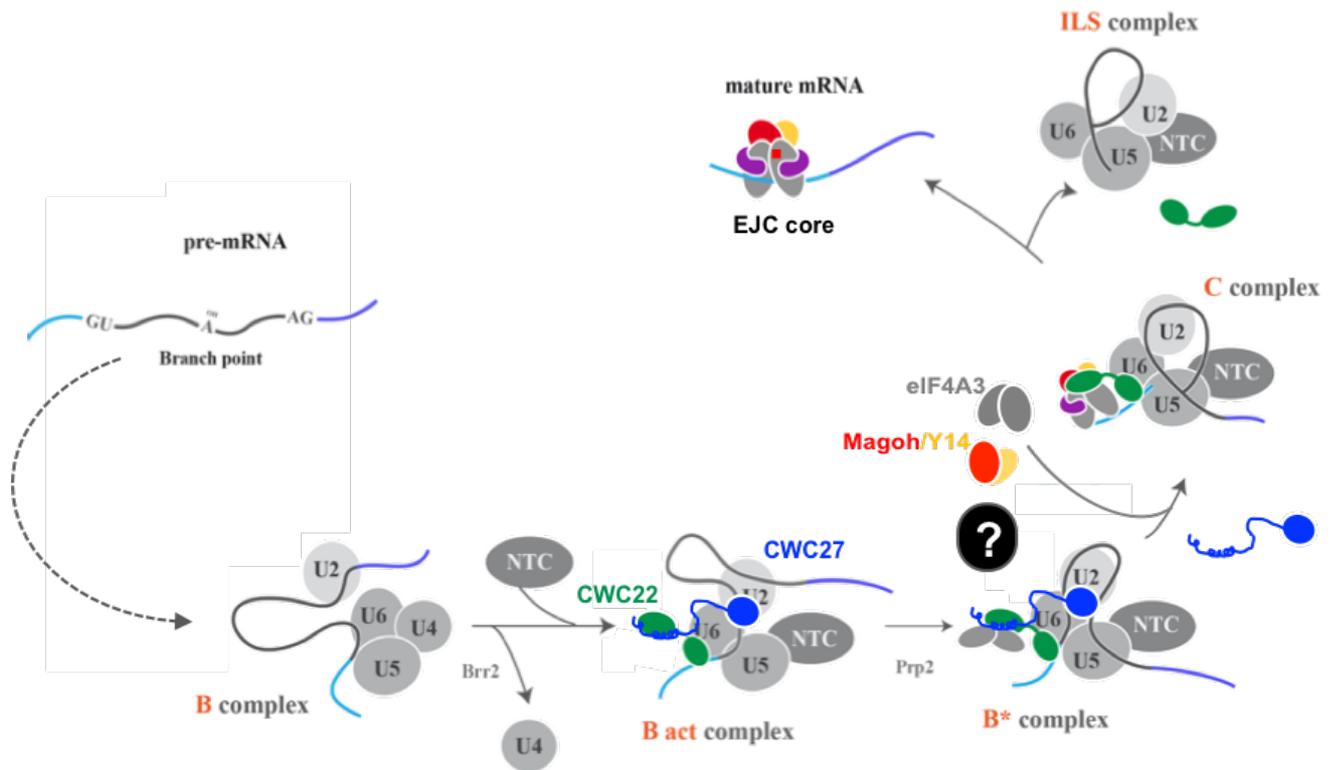


Figure 24: Modèle possible de l'assemblage de l'EJC.

Ces résultats devront être approfondis pour déterminer précisément les domaines d'interaction à l'aide par exemple de protéines recombinantes tronquées de CWC22, de CWC27 et de eIF4A3.

3. UN NOUVEAU MODELE D'ASSEMBLAGE DE L'EJC

Récemment, plusieurs études structurales ont révélé plus finement la structure du spliceosome à plusieurs stades de son assemblage (Bertram et al., 2017; Zhang et al., 2017, 2018). Lors de ces études, les spliceosomes sont purifiés à partir de réaction d'épissage *in vitro* puis analysés par cryo-microscopie électronique. Les protéines CWC27, CWC22 et les protéines du cœur de l'EJC ne sont pas détectées dans tous les complexes. Cependant, les connaissances acquises au cours de ce projet permettent de replacer les protéines CWC22, CWC27 et eIF4A3 dans le schéma actuel de l'assemblage de la machinerie d'épissage (**Figure 24**). En effet, on sait par la littérature que les protéines CWC22 et CWC27 sont détectées dans le complexe B activé (B^{act}) alors que dans ce complexe les protéines de l'EJC ne le sont pas. Le complexe suivant est le complexe B^* mais celui-ci n'a pas été purifié et analysé à ce jour. S'en suit le complexe C, dans lequel la première réaction d'épissage a eu lieu. De manière intéressante, dans ce complexe la protéine CWC22 et les protéines de l'EJC sont détectées mais pas CWC27. Il est donc possible que les protéines CWC22 et CWC27 soient recrutées sous forme d'un hétérodimère dans le complexe B^{act} . Dans le complexe suivant, eIF4A3 serait recruté par CWC22 et CWC27. A la suite de quoi, dans le complexe C, le départ de CWC27 permettrait l'assemblage d'un pré-EJC en présence de CWC22. Finalement, CWC22 se dissocierait pour permettre l'assemblage de l'EJC final. Ainsi, l'assemblage de l'EJC pourrait avoir lieu en deux étapes successives. Cependant, de nombreuses interrogations subsistent, notamment concernant l'étape à laquelle sont recrutés eIF4A3 et les autres facteurs du cœur de l'EJC. La structure de nouveaux complexes intermédiaires du spliceosome permettra sûrement d'éclaircir ce mécanisme.

V.PERSPECTIVES

Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives tant sur le plan structural que fonctionnel. D'un point de vue structural, nous souhaitons davantage caractériser le complexe CWC22-CWC27-eIF4A3. En effet nous supposons que CWC27 interagit par sa partie C-terminale car une isoforme plus courte de la protéine dans laquelle les 100 derniers acides aminés ont été délétés, n'interagit pas avec la protéine CWC22. Afin de confirmer cette hypothèse, nous envisageons au laboratoire de produire plusieurs tronctions de la protéine CWC27 pour préciser son domaine d'interaction avec les protéines CWC22 et/ou eIF4A3. Ayant réussi à reconstituer ce complexe, nous avons déjà engagé une collaboration avec l'équipe d'Elena Conti (Martinsried, Allemagne) pour qu'elle tente de résoudre sa structure cristallographique. Enfin il est envisagé de tenter la reconstitution des différentes étapes de l'assemblage de l'EJC afin de comprendre l'ordre dans lequel chaque protéine intervient.

D'un point de vue fonctionnel, nous souhaitons désormais caractériser le rôle de la protéine CWC27 dans l'assemblage de l'EJC. Dans un premier temps, des siRNAs seront utilisés afin de réduire l'expression de CWC27 dans des cellules humaines pour mesurer l'effet *in vivo* de CWC27 sur l'assemblage de l'EJC et sur ces fonctions. D'autre part, une fois la structure du complexe obtenue, nous pourrons entreprendre la production de mutants ciblés pour les 3 protéines (eIF4A3, CWC22 et CWC27) afin de les tester *in vivo* et *in vitro*. Dans cette dernière approche l'étude de l'impact des mutations de CWC27 actuellement associées aux maladies génétiques déjà décrites (Xu et al., 2017) sera entreprise.

A moyen terme, nous espérons ainsi que ces études permettront de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage de l'EJC par la machinerie d'épissage, leur régulation et le rôle de l'EJC dans la régulation de l'expression de certains transcrits.

BIBLIOGRAPHIE

Albers, C.A., Paul, D.S., Schulze, H., Freson, K., Stephens, J.C., Smethurst, P.A., Jolley, J.D., Cvejic, A., Kostadima, M., Bertone, P., et al. (2012). Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat. Genet.* *44*, 435–439.

Andersen, C.B.F., Ballut, L., Johansen, J.S., Chamieh, H., Nielsen, K.H., Oliveira, C.L.P., Pedersen, J.S., Séraphin, B., Hir, H.L., and Andersen, G.R. (2006). Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA. *Science* *313*, 1968–1972.

Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., and Le Hir, H. (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 861–869.

Barbosa, I., Haque, N., Fiorini, F., Barrandon, C., Tomasetto, C., Blanchette, M., and Le Hir, H. (2012). Human CWC22 escorts the helicase eIF4AIII to spliceosomes and promotes exon junction complex assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 983–990.

Bertram, K., Agafonov, D.E., Liu, W.-T., Dybkov, O., Will, C.L., Hartmuth, K., Urlaub, H., Kastner, B., Stark, H., and Lührmann, R. (2017). Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature* *542*, 318–323.

Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* *452*, 846–850.

Buchwald, G., Schussler, S., Basquin, C., Le Hir, H., and Conti, E. (2013). Crystal structure of the human eIF4AIII-CWC22 complex shows how a DEAD-box protein is inhibited by a MIF4G domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E4611–E4618.

Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 85–93.

Chazal, P.-E., Daguene, E., Wendling, C., Ulryck, N., Tomasetto, C., Sargueil, B., and Le Hir, H. (2013). EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 5903–5908.

Daguene, E., Baguet, A., Degot, S., Schmidt, U., Alpy, F., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Rio, M.-C., Le Hir, H., et al. (2012). Perispeckles are major assembly sites for the exon junction core complex. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1765–1782.

Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2006). Protein Composition and Electron Microscopy Structure of Affinity-Purified Human Spliceosomal B Complexes Isolated under Physiological Conditions. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5528–5543.

Degot, S., Régnier, C.H., Wendling, C., Chenard, M.-P., Rio, M.-C., and Tomasetto, C. (2002). Metastatic Lymph Node 51, a novel nucleo-cytoplasmic protein overexpressed in breast cancer. *Oncogene* *21*, 4422–4434.

van Eeden, F.J.M., Palacios, I.M., Petronczki, M., Weston, M.J.D., and St Johnston, D. (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of *oskar* mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J. Cell Biol.* *154*, 511–524.

Favaro, F.P., Alvizi, L., Zechi-Ceide, R.M., Bertola, D., Felix, T.M., de Souza, J., Raskin, S., Twigg, S.R.F., Weiner, A.M.J., Armas, P., et al. (2014). A Noncoding Expansion in EIF4A3 Causes Richieri-Costa-Pereira Syndrome, a Craniofacial Disorder Associated with Limb Defects. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 120–128.

Fiorini, F., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2012). Biochemical characterization of the RNA helicase UPF1 involved in nonsense-mediated mRNA decay. *Methods Enzymol.* *511*, 255–274.

Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2009). The Hierarchy of Exon-Junction Complex Assembly by the Spliceosome Explains Key Features of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *PLoS Biol.* *7*, e1000120.

Giorgi, C., Yeo, G.W., Stone, M.E., Katz, D.B., Burge, C., Turrigiano, G., and Moore, M.J. (2007). The EJC Factor eIF4AIII Modulates Synaptic Strength and Neuronal Protein Expression. *Cell* 130, 179–191.

Glanzer, J., Miyashiro, K.Y., Sul, J.-Y., Barrett, L., Belt, B., Haydon, P., and Eberwine, J. (2005). RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 16859–16864.

Hachet, O., and Ephrussi, A. (2001). *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr. Biol.* 11, 1666–1674.

Hachet, O., and Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* 428, 959–963.

He, F., and Jacobson, A. (2015). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu. Rev. Genet.* 49, 339–366.

Kugler, J.-M., and Lasko, P. (2009). Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly (Austin)* 3, 15–28.

Lau, I.F., Filipe, S.R., Søballe, B., Økstad, O.-A., Barre, F.-X., and Sherratt, D.J. (2003). Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol. Microbiol.* 49, 731–743.

Le Hir, H. (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860–6869.

Le Hir, H. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20, 4987–4997.

Le Hir, H., Saulière, J., and Wang, Z. (2016). The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 41–54.

Lehalle, D., Wieczorek, D., Zechi-Ceide, R.M., Passos-Bueno, M.R., Lyonnet, S., Amiel, J., and Gordon, C.T. (2015). A review of craniofacial disorders caused by spliceosomal defects. *Clin. Genet.* *88*, 405–415.

Levy, N., Eiler, S., Pradeau-Aubret, K., Maillot, B., Stricher, F., and Ruff, M. (2016). Production of unstable proteins through the formation of stable core complexes. *Nat. Commun.* *7*.

Long, J.C., and Caceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* *417*, 15–27.

Lykke-Andersen, S., and Jensen, T.H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 665–677.

Ma, X.M., Yoon, S.-O., Richardson, C.J., Jülich, K., and Blenis, J. (2008). SKAR Links Pre-mRNA Splicing to mTOR/S6K1-Mediated Enhanced Translation Efficiency of Spliced mRNAs. *Cell* *133*, 303–313.

Macchi, P., Kroening, S., Palacios, I.M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Goetze, B., Lupas, A., St. Johnston, D., and Kiebler, M. (2003). Barentsz, a New Component of the Staufen-Containing Ribonucleoprotein Particles in Mammalian Cells, Interacts with Staufen in an RNA-Dependent Manner. *J. Neurosci.* *23*, 5778–5788.

Malone, C.D., Mestdagh, C., Akhtar, J., Kreim, N., Deinhard, P., Sachidanandam, R., Treisman, J., and Roignant, J.-Y. (2014). The exon junction complex controls transposable element activity by ensuring faithful splicing of the piwi transcript. *Genes Dev.* *28*, 1786–1799.

Mao, H., McMahon, J.J., Tsai, Y.-H., Wang, Z., and Silver, D.L. (2016). Haploinsufficiency for Core Exon Junction Complex Components Disrupts Embryonic Neurogenesis and Causes p53-Mediated Microcephaly. *PLOS Genet.* *12*, e1006282.

Mohr, S.E., Dillon, S.T., and Boswell, R.E. (2001). The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* *15*, 2886–2899.

Monshausen, M., Gehring, N.H., and Kosik, K.S. (2004). The mammalian RNA-binding protein *stau2* links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *NeuroMolecular Med.* 6, 127–144.

Nott, A., Hir, H.L., and Moore, M.J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.* 18, 210–222.

Ohi, M.D., and Gould, K.L. (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA* 8, 798–815.

Saulière, J., Murigneux, V., Wang, Z., Marquet, E., Barbosa, I., Le Tonquèze, O., Audic, Y., Paillard, L., Crollius, H.R., and Le Hir, H. (2012). CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1124–1131.

Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Weng, Z., and Moore, M.J. (2012). The Cellular EJC Interactome Reveals Higher-Order mRNP Structure and an EJC-SR Protein Nexus. *Cell* 151, 750–764.

Singh, G., Pratt, G., Yeo, G.W., and Moore, M.J. (2015). The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 325–354.

Steckelberg, A.-L., Boehm, V., Gromadzka, A.M., and Gehring, N.H. (2012). CWC22 Connects Pre-mRNA Splicing and Exon Junction Complex Assembly. *Cell Rep.* 2, 454–461.

Tange, T.Ø., Nott, A., and Moore, M.J. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 279–284.

Ulrich, A., and Wahl, M.C. (2014). Structure and evolution of the spliceosomal peptidyl-prolyl *cis* – *trans* isomerase Cwc27. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 3110–3123.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 136, 701–718.

Wang, Z., and Murigneux, V. (2014). Transcriptome-wide modulation of splicing by the exon junction complex. *18*.

Wang, Z., Ballut, L., Barbosa, I., and Le Hir, H. (2018). Exon Junction Complexes can have distinct functional flavours to regulate specific splicing events. *Sci. Rep.* *8*.

Will, C.L., and Luhrmann, R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a003707–a003707.

Xu, M., Xie, Y. (Angela), Abouzeid, H., Gordon, C.T., Fiorentino, A., Sun, Z., Lehman, A., Osman, I.S., Dharmat, R., Riveiro-Alvarez, R., et al. (2017). Mutations in the Spliceosome Component CWC27 Cause Retinal Degeneration with or without Additional Developmental Anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* *100*, 592–604.

Yeh, T.-C., Liu, H.-L., Chung, C.-S., Wu, N.-Y., Liu, Y.-C., and Cheng, S.-C. (2011). Splicing Factor Cwc22 Is Required for the Function of Prp2 and for the Spliceosome To Escape from a Futile Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 43–53.

Zhang, X., Yan, C., Hang, J., Finci, L.I., Lei, J., and Shi, Y. (2017). An Atomic Structure of the Human Spliceosome. *Cell* *169*, 918-929.e14.

Zhang, X., Yan, C., Zhan, X., Li, L., Lei, J., and Shi, Y. (2018). Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. *Cell Res.* *28*, 307–322.

ANNEXE