

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**MODULATION DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE  
L'ANGIOGÉNINE HUMAINE PAR CRIBLAGE DE PETITES MOLÉCULES:  
ÉVALUATION DE L'IMPACT BIOLOGIQUE ET DES PROPRIÉTÉS  
BIOPHYSIQUES**

Par  
BUI, TRUNG HIEU

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences d'expérimentales de la santé

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

St-Pierre, Yves  
INRS – Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Gobeil, Sophie  
Université Laval – Faculté des Sciences  
et de génie

Directeur de recherche

Doucet, Nicolas  
INRS – Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

## REMERCIEMENTS

---

Lorsque je réfléchis au parcours qui m'a mené à ce moment crucial, je suis profondément reconnaissant envers les personnes qui ont joué un rôle essentiel dans la formation de mon développement académique et personnel.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Pr. Nicolas Doucet (surnommé affectueusement Nick), Directeur de recherche, pour son soutien et ses conseils incessants. La guidance de Nick a été déterminante pour m'offrir l'opportunité de travailler dans son laboratoire et de participer à ce projet remarquable. Son engagement indéfectible à soutenir les étudiants est vraiment inspirant, en particulier pendant les défis posés par le confinement lié à la COVID-19, lorsqu'il a fait de son mieux pour m'assurer un voyage sécuritaire au Canada et faciliter mon stage de courte durée. Avec une profonde humilité, je reconnais la valeur inestimable de la contribution de Nick à mes activités académiques, de mon développement en tant que stagiaire jusqu'à l'opportunité de poursuivre un programme de Maîtrise à l'INRS. Comme le dit un ancien proverbe vietnamien, l'une des trois plus grandes chances dans la vie est d'avoir un excellent mentor, et Nick en est certainement un - un conseiller qui a transmis non seulement des connaissances académiques, mais aussi des leçons de vie inestimables. Je ne peux exprimer en mots toute ma gratitude envers lui.

À différentes étapes de ce projet, plusieurs expériences ont été réalisées avec l'aide enthousiaste et dévouée de certaines personnes. Je tiens à remercier Yarileny Castellanos et Olga Lucia Saavedra Sanabria (que je n'ai malheureusement pas eu la chance de rencontrer en personne) pour leurs analyses remarquables sur l'impact des fragments sur la capacité de séparation de l'ARNt de hANG in vitro, que j'ai utilisées dans la discussion de mon mémoire.

Je suis également extrêmement reconnaissant envers les membres avec lesquels j'ai eu la chance d'interagir ou de travailler, qui ont généreusement partagé leur expertise et m'ont soutenu sans relâche tout au long de ce parcours. Myriam, pour ses conseils sur l'établissement des méthodes de culture cellulaire et des techniques de base en recherche sur les interactions protéine-ligand ; Sacha Larda (INRS) et Tara Sprules (Université McGill), pour leur soutien technique dans les analyses RMN et les titrages. Mes sincères remerciements à Pr. Yves St-Pierre et son équipe, pour leurs précieux conseils sur les tests basés sur les cellules ; France Caza, pour ses suggestions d'experte sur la mise en place des réactions RT-qPCR ; Sophie Boucher, pour ses conseils techniques sur l'extraction d'ARN ; Marlène Fortier, pour la technique d'apoptose cellulaire. Ensuite, je remercie chaleureusement Pr. Laurent Chatel-Chaix et son

équipe, pour leur expertise dans les tests de stress mitochondrial et la microscopie confocale. Felicia, du laboratoire de Jonathan, pour son soutien technique et ses fournitures pour l'analyse des ARNti. Mes sincères remerciements à Pr. Charles Calmette, pour ses conseils sur la cristallographie des protéines et la chromatographie d'exclusion. Je suis également reconnaissant envers les membres du laboratoire de Nicolas Doucet - Quynh Tran, Alex Paré, Mighel Bernier, Linh Nguyen et Yari Castellanos - pour leur esprit de collaboration et leur volonté de partager leurs ressources pendant notre travail ensemble.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous ceux qui ont été essentiels dans ce parcours. Merci à mes collègues du comité organisateur de la CAF 2023 : Sitan Diarra, Antoine Gillet, Madeleine Lépine, Fanny Fronton, Alex Paré, Carole Anamalé, Ahmad Kezzo, Eléonore Delaire, Aymen Ben Abdeljalil. Vous avez travaillé avec acharnement pour faire de cette conférence un succès. Merci pour ces moments de joie et de sens partagés lors des activités de collecte de fonds et d'organisation d'événements. Cette expérience a renforcé mon sens des responsabilités professionnelles et mes compétences en gestion du temps, contribuant grandement à mon développement personnel. Je tiens également à remercier chaleureusement Cyrielle Martini, Camille Fuselier, Abdelkader Mellouk, Michel Lê, Victoria Araba, Mariem Chalbi, Paola Raúl Armoa Ortiz, Francisco Pulido, Ambarish Ganesan, Hoang-Van Tran, Viviana Andrea, Rita Nehmé et Hala El-Asmy pour les moments inoubliables partagés à l'institut.

Enfin, ma plus profonde gratitude va à ma famille - ma petite fille Vy Bui, mon épouse bien-aimée Hang Lê et mes proches au Vietnam - pour leur soutien indéfectible, leur compréhension et leur confiance inébranlable en mes capacités tout au long de ce parcours académique. Leur encouragement et leur présence constante ont été une source de force et d'inspiration inestimable.

À chacun d'entre vous, je suis sincèrement reconnaissant pour vos contributions inestimables à mes efforts de recherche et à mon développement personnel. Vos conseils, votre expertise et votre soutien continu ont joué un rôle essentiel dans la construction de mon parcours d'apprentissage, et je vous en serai éternellement reconnaissant pour l'impact profond que vous avez eu sur ma vie.

Cordialement,

Trung Hieu Bui

## RÉSUMÉ

---

L'angiogénine humaine (hANG), également connue sous le nom de ribonucléase 5, est un facteur de croissance multifonctionnel qui joue un rôle vital dans le développement des vaisseaux sanguins et divers processus biologiques complexes associés à différentes conditions pathologiques. Des recherches récentes ont montré que l'expression fonctionnelle de hANG dépend grandement de sa capacité à se transloquer dans le noyau cellulaire et à se relocaliser dans différents compartiments intracellulaires en fonction des conditions cellulaires changeantes. Des études indiquent également que la relocalisation de hANG est associée à plusieurs pathologies neurologiques. Cela suscite notre curiosité quant à l'influence de la relocalisation de hANG en fonction de ses diverses activités moléculaires. Dans cette étude, nous avons cherché à développer des modulateurs allostériques de hANG capables d'inhiber certains de ses rôles spécifiques dans la progression de cellules cancéreuses. En utilisant la RMN, nous avons criblé une petite bibliothèque chimique de fragments et identifié deux modulateurs potentiels, 5P et 5F. Des analyses de microscopie confocale basée sur la fluorescence et des immunobuvardages de type Western ont montré que 5P pouvait améliorer, tandis que le 5F n'avait aucun effet significatif sur la translocation nucléaire de l'hANG dans les cellules HeLa, même si les deux petites molécules inhibent la prolifération des cellules HeLa associée à hANG. D'autre part, nous avons constaté que la néomycine (Neo), un antibiotique aminoglycoside connu pour inhiber la translocation nucléaire de hANG peut interagir directement avec hANG. Enfin, nous présentons certaines des activités de hANG qui sont affectées lorsque l'enzyme est relocalisée : dans un état de translocation nucléaire améliorée (par 5P) ou de translocation nucléaire inhibée (par Neo). Les résultats du projet peuvent fournir des preuves de nouvelles approches pour le développement de modulateurs ciblant les protéines pour le traitement des pathologies.

Mots clés: angiogénine humaine, RNase 5, progression du cancer, relocalisation subcellulaire, modulation

## ABSTRACT

---

Human angiogenin (hANG), also known as ribonuclease 5, is a multifunctional growth factor that plays a vital role in developing blood vessels and various complex biological processes associated with different pathological conditions. Recent research has shown that the functional expression of hANG depends greatly on its ability to translocate into the cell nucleus and relocalize within different subcellular compartments under changing cellular conditions. Studies also indicate that the relocalization of hANG is associated with several neurological pathologies. This prompts consideration of the impact of hANG subcellular relocalization on its diverse molecular activities. In this study, we aimed to develop allosteric modulators of hANG that can inhibit some of its specific roles in tumor progression. Using NMR, we screened a small chemical library of fragments and identified two potential small-molecule modulators, 5P and 5F. Our results show that both compounds inhibit hANG-associated HeLa cell proliferation, while fluorescence-based confocal microscopy and Western blotting analyses illustrate that 5P can enhance nuclear translocation. In parallel, we found that the aminoglycoside antibiotic neomycin (Neo) can also inhibit nuclear translocation by directly interacting with hANG. Finally, we show that hANG activity is altered either through enhanced nuclear translocation (facilitated by 5P) or upon suppressed nuclear translocation (induced by Neo). Our findings may provide evidence supporting novel strategies for the development of protein-targeting modulators in various pathologies.

Keywords: human angiogenin, RNase 5, cancer progression, subcellular relocalization, modulation

## TABLE DES MATIÈRES

---

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 APERÇU DE LA SUPERFAMILLE DES RIBONUCLÉASES DE TYPE PANCRÉATIQUE (PTRNASE).....	1
1.2 RNASE 5 HUMAINE, OU ANGIOGÉNINE (HANG).....	7
1.2.1 <i>Aperçu de la structure de la RNase 5 et de son activité catalytique</i> .....	7
1.2.2 <i>Mécanismes d'action de hANG</i> .....	11
1.3 L'ANGIOGÉNINE (HANG) ET LES CONDITIONS PATHOLOGIQUES ASSOCIÉES.....	18
1.3.1 <i>hANG dans l'angiogenèse tumorale</i> .....	18
1.3.2 <i>Observations suggérant le rôle de hANG dans le développement tumoral</i> .....	20
1.3.3 <i>hANG et les troubles neurodégénératifs</i> .....	21
1.4 LOCALISATION CELLULAIRE ET FONCTION BIOLOGIQUE DE HANG.....	24
1.4.1 <i>La translocation nucléaire de hANG</i> .....	24
1.4.2 <i>Compréhension récente de l'effet de la néomycine sur la localisation cellulaire de hANG</i> .....	25
1.4.3 <i>Une nouvelle molécule améliore la translocation nucléaire de hANG</i> .....	26
1.5 PROJET DE RECHERCHE.....	28
1.5.1 <i>Énoncé du problème</i> .....	28
1.5.2 <i>Hypothèse et objectifs de recherche</i> .....	30
2 MÉTHODOLOGIE.....	31

2.1	MATÉRIAUX.....	31
2.1.1	<i>Souches bactériennes</i> .....	31
2.1.2	<i>Lignée cellulaire</i> .....	31
2.2	EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ANGIOGÉNINE HUMAINE RECOMBINANTE (HANG).....	31
2.2.1	<i>Expression de l'angiogénine humaine recombinante (hANG)</i> .....	31
2.2.2	<i>Repliement in vitro et purification de l'angiogénine humaine recombinante</i> .....	32
2.2.3	<i>Évaluation du repliement correct de la protéine et de son activité catalytique</i> .....	33
2.3	TEST D’AFFINITÉ DE LIAISON.....	33
2.3.1	<i>Titrages par résonance magnétique nucléaire (RMN)</i> .....	33
2.3.2	<i>Thermophorèse à micro-échelle (MST)</i> .....	34
2.3.3	<i>Titrage calorimétrique isotherme (ITC)</i> .....	35
2.4	ESSAIS BIOLOGIQUES .....	36
2.4.1	<i>Viabilité/prolifération cellulaire</i> .....	36
2.4.2	<i>Essais de translocation nucléaire</i> .....	37
2.4.3	<i>Essai d'apoptose cellulaire avec la doxorubicine (essai PARP-1)</i> .....	39
2.4.4	<i>Immunobuvardage de type Western</i> .....	39
2.4.5	<i>Analyse des fragments de ARNt</i> .....	40
2.4.6	<i>RT-qPCR</i> .....	41
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	43
3.1	EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ANGIOGÉNINE HUMAINE (OBJECTIF 1).....	43
3.1.1	<i>Optimisation de l'expression et de la purification des protéines</i> .....	43
3.1.2	<i>Confirmation du repliement des protéines</i> .....	45
3.2	ÉTUDE IN VITRO DE L’AFFINITÉ DE LIAISON DES FRAGMENTS CIBLANT HANG (OBJECTIF 2).....	49
3.2.1	<i>Thermophorèse à l'échelle microscopique (MST) et calorimétrie de titration isotherme (ITC)</i> .....	49
3.2.2	<i>Titrages RMN</i> .....	50

3.3	ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ANGIOGÉNINE LORS DE LA MODULATION DE SA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DANS LES CELLULES HELA (OBJECTIF 3) .....	59
3.3.1	<i>Évaluation des effets des fragments de composés chimiques sur la viabilité des cellules HeLa et la prolifération cellulaire induite par hANG .....</i>	<i>60</i>
3.3.2	<i>Évaluation des effets des fragments de composés chimiques sur la localisation subcellulaire de hANG.....</i>	<i>62</i>
3.3.3	<i>Effet d'une modulation de l'accumulation nucléaire de hANG sur la transcription du pré-ARNr 47S dans les cellules HeLa.....</i>	<i>67</i>
3.3.4	<i>La modulation de l'accumulation nucléaire de hANG impacte-t-elle les voies de survie cellulaire ? .....</i>	<i>70</i>
3.3.5	<i>L'impact de la relocalisation subcellulaire de hANG par les composés (5P et Neo) modulant le clivage de l'ARNt sous stress oxydatif.....</i>	<i>73</i>
4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	77
5	BIBLIOGRAPHIE.....	80
6	ANNEXE.....	94
6.1	FIGURE .....	94
6.2	MILIEU .....	102

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1.1 STRUCTURE DE LA RNASE A. ....	2
FIGURE 1.2 ALIGNEMENT DE SÉQUENCE DES HUIT RIBONUCLÉASES CANONIQUES HUMAINES. ....	3
FIGURE 1.3 STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ANGIOGÉNINE HUMAINE (HANG, RNASE 5).....	10
FIGURE 1.4 APERÇU DU MÉCANISME INTRACELLULAIRE ET DES VOIES DE SIGNALISATION AUXQUELLES PARTICIPE HANG .....	15
FIGURE 1.5 ASPECTS FONCTIONNELS DE HANG OBSERVÉS À PLUSIEURS STADES AVANCÉS DE CERTAINS TYPES DE CANCERS ET CHEZ CERTAINES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES.....	21
FIGURE 1.6 ACTIVITÉ NEUROPROTECTRICE DE HANG DANS LES ASTROCYTES ET LES NEURONES MOTEURS.....	24
FIGURE 1.7 STRUCTURE CHIMIQUE DE LA NÉOMYCINE .....	26
FIGURE 1.8 EFFETS PROPOSÉS DES MODULATEURS DE PETITES MOLÉCULES SUR LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HANG.....	29
FIGURE 2.1 PROTOCOLE D'EXPRESSION ET DE PURIFICATION DE L'ANGIOGÉNINE HUMAINE UTILISÉ DANS LA PRÉSENTE ÉTUDE. ....	32
FIGURE 2.2 ESSAI DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE RÉALISÉ DANS LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	36
FIGURE 2.3 ESSAIS DE TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HANG RÉALISÉS DANS LA PRÉSENTE ÉTUDE	38
FIGURE 2.4 TRAITEMENT DES CELLULES HELA POUR L'ANALYSE DES ARNTI RÉALISÉE DANS LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	41
FIGURE 2.5 TRAITEMENT DES CELLULES HELA POUR L'ANALYSE RT-PCR RÉALISÉE DANS LA PRÉSENTE ÉTUDE. ....	42
FIGURE 3.1 EXPRESSION ET PURIFICATION DE HANG.....	45
FIGURE 3.2 RENATURATION ET CARACTERISATION PRELIMINAIRES DE HANG .....	47
FIGURE 3.3 AFFINITÉ DE LIAISON DE HANG ET DE NEO CALCULÉE EN UTILISANT .....	50
FIGURE 3.4 TITRAGE RMN DE <sup>15</sup> N-HANG PAR NEO DANS 15 MM D'ACÉTATE DE SODIUM, PH 5,0. ..	53
FIGURE 3.5 TITRAGE RMN DE <sup>15</sup> N-HANG PAR 5P DANS 15 MM D'ACÉTATE DE SODIUM, PH 5,0.....	54
FIGURE 3.6 TITRAGE RMN DE <sup>15</sup> N-HANG PAR 5F DANS 15 MM D'ACÉTATE DE SODIUM, PH 5,0. ....	55

FIGURE 3.7 SITES DE LIAISON POTENTIELS DES COMPOSÉS NEO, 5P ET 5F SUR LA STRUCTURE DE HANG BASÉS SUR LES PERTURBATIONS COMPOSÉES DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  RMN. .... 58

FIGURE 3.8 IMPACT DES COMPOSÉS 5P ET 5F SUR LA VIABILITÉ CELLULAIRE ET LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE INDUITE PAR HANG ..... 61

FIGURE 3.9 MICROSCOPIE CONFOCALE À IMMUNOFLUORESCENCE PERMETTANT D'OBSERVER LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HANG EXOGÈNE (100 NM) DANS LES CELLULES HELA..... 64

FIGURE 3.10 ANALYSE PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN DES NIVEAUX DE TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HANG EXOGÈNE DANS LES CELLULES HELA DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE TRAITEMENT..... 66

FIGURE 3.11 LA MODULATION DE L'ACCUMULATION NUCLÉAIRE DE HANG PAR LES COMPOSÉS (5P, NEO) AFFECTE LES NIVEAUX DE TRANSCRIPTION DE PRÉ-ARNR 47S, MESURÉS PAR RT-QPCR. .... 68

FIGURE 3.12 MODULATION DE L'ACCUMULATION NUCLÉAIRE DE HANG PAR 5P ET NEO ET SON IMPACT SUR LES VOIES DE SURVIE CELLULAIRE MESURÉES PAR LE CLIVAGE DE PARP-1 EN UN FRAGMENT DE 24 kDa PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN ..... 72

FIGURE 3.13 MODULATION DU CLIVAGE DES ARNT SOUS STRESS OXYDATIF PAR LA RELOCALISATION SUBCELLULAIRE DE HANG PAR 5P ET NEO. LES FRAGMENTS D'ARNTI ONT ÉTÉ ANALYSÉS À PARTIR D'ARN TOTAL EXTRAIT DE CELLULES HELA SUR UN GEL D'ARN ..... 75

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1.1 RÉSUMÉ DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES HUIT RNASES HUMAINES CANONIQUES ET DES PATHOLOGIES ASSOCIÉES .....	5
TABLEAU 1.2 FRAGMENTS OBTENUS APRÈS LE CRIBLAGE DE LA DÉCOUVERTE DE MÉDICAMENTS BASÉE SUR LES FRAGMENTS DE HANG.....	26

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ARN : Acide ribonucléique

ARNex: Acide ribonucléique extracellulaire

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNt: Acide ribonucléique de transfert

ARNti : « tRNA-derived stress-induced RNA » ou ARN dérivé de l'ARN de transfert

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

bFGF: « Basic fibroblast growth factor » ou facteurs de croissance fibroblastique basique

CBS : « Cell-binding segments » ou segments de liaison cellulaire

CPAE : « Calf pulmonary artery endothelial cell » ou cellule endothéliale de l'artère pulmonaire de veau

Da : Dalton

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DOX : Doxorubicine

EA.hy926 : Lignée cellulaire issue de la fusion de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) avec la lignée cellulaire tumorale A549.

ECP : Protéine cationique des éosinophiles

EDN : Neurotoxine dérivée des éosinophiles

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : « Endothelial growth factor receptor » ou récepteur au facteur de croissance endothéliale

EMT: Transition épithéliale-mésenchymateuse

ERK $\frac{1}{2}$  : « Extracellular signal-regulated kinase »

FAK : « Focal adhesion kinase » ou kinase d'adhésion focale

FBS : Sérum foetal bovin

FDA : Food and Drugs Administration

hANG : RNase 5 (angiogénine humaine)

HEK293: Cellules rénales embryonnaires humaines 293

HSQC : Spectroscopie hétéronucléaire à cohérence quantique unique

HUVEC : Cellules endothéliales humaines de veine ombilicale

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

ITC : Titrage calorimétrique isotherme

$K_D$  : Constante de dissociation

$K_i$  : Constante d'inhibition

M : Molaire

MA : Maladie d'Alzheimer

Mdm2 : Murine double minute 2

MMP2 : Métalloprotéase de matrice 2

MP : Maladie de Parkinson

MST : Thermophorèse à micro-échelle

MTOR : Cible mammalienne de la rapamycine

Neo: Néomycine

NF- $\kappa$ B: « Nuclear factor-kappa B » ou facteur nucléaire-kappa B

NLS : « Nuclear localisation signal » ou signal de localisation nucléaire

NOS : « Nitric oxide synthase » ou synthase de monoxyde d'azote

Nrf2 : « Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 », ou « facteur de transcription à fermeture éclair de leucine »

PDAC : Cellules adénocarcinomeuses pancréatiques

PDB : Protein data bank

PIC : « Protease inhibitor cocktail » ou cocktail d'inhibiteurs de protéases

PLXNB2 : Plexine-B2

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PVDF: « Polyvinylidene fluoride » ou polyvinylidène fluorure

ptRNase: « Pancreatic-type ribonuclease » ou ribonucléase de type pancréatique

RI : « Ribonuclease inhibitor » ou inhibiteur de ribonucléase

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNase : Ribonucléase

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

RT-qPCR : « Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction » ou « Réaction en chaîne par polymérase avec transcription inverse quantitative (RT-qPCR) »

SAP : Système activateur du plasminogène

SAPK/JNK : Protéine kinase associée au stress/c-Jun N-terminal

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SEM : Écart-type standard

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

STD : Saturation transfert difference

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VPH: Virus du papillome humain

$\Delta\delta$  (ppm): Variation de déplacement chimique

5P : 5-(2-Fluorophenyl)-picolinic acid

5F : 5-(4-Fluorophenyl)-picolinic acid

# 1 INTRODUCTION

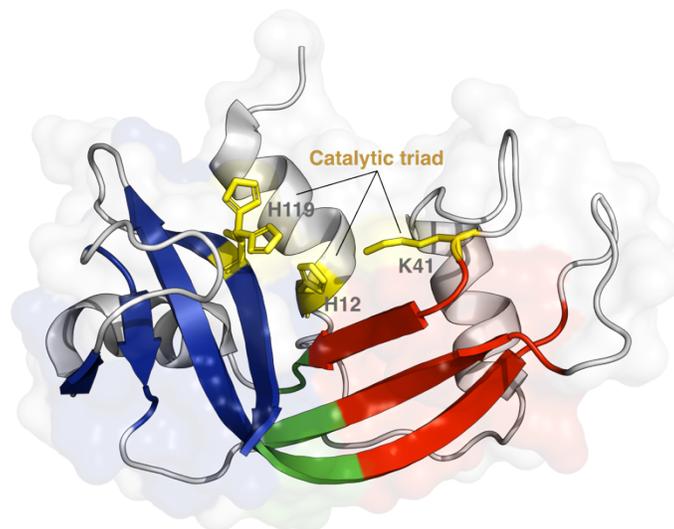
---

## 1.1 Aperçu de la superfamille des ribonucléases de type pancréatique (ptRNase)

La RNase A est la ribonucléase la plus largement étudiée dans la recherche (Donà & Houseley, 2014). Elle est connue comme membre principal de la famille des ribonucléases pancréatiques et a été trouvée en grandes quantités dans le pancréas de certains mammifères et de quelques reptiles (Beintema & van der Laan, 1986). La RNase A est une endoribonucléase qui attaque le phosphate en 3' d'un nucléotide pyrimidique. Elle se trouve principalement à l'extérieur des cellules, sécrétée par le pancréas (Gotte & Menegazzi, 2019). La RNase A a également été la première enzyme synthétisée artificiellement, démontrant que des molécules biologiquement fonctionnelles peuvent être créées artificiellement (Jackson et al., 1994). Cette découverte a valu le prix Nobel à Christian B. Anfinsen en 1972. La RNase A est une protéine sécrétée, composée de 124 acides aminés et d'une masse moléculaire de 13,7 kDa (Gagné & Doucet, 2013). Sur le plan structural, elle présente un repliement en forme de V créé par deux domaines opposés (Figure 1.1), appelés V1 (résidus bleus 61–63, 71–75, 105–111 et 116–124) et V2 (résidus rouges 42–46, 82–87 et 96–101). La région charnière (verte) (Figure 1.1) est définie par les résidus 47–48, 80–81 et 102–104. La RNase A peut transphosphoryler et hydrolyser l'acide ribonucléique (ARN) et effectuer le clivage des liaisons phosphodiester par un mécanisme acide-base (Moussaoui et al., 2007). Cette réaction de clivage est facilitée par une triade catalytique composée des résidus K41, H12 et H119, où H12 agit comme un catalyseur acide et H119 comme un catalyseur base. Simultanément, K41 stabilise l'état de transition (Gagné & Doucet, 2013) (Figure 1.1).

Bien que la RNase A agisse comme le membre prototypique de la famille, plusieurs enzymes homologues sur le plan structural et fonctionnel ont été identifiées chez les mammifères et d'autres vertébrés, formant la superfamille de type pancréatique (ptRNase). Les représentants humains de cette superfamille comprennent 13 membres, dont huit RNases canoniques catalytiquement actives (RNase 1-8) et cinq RNases non canoniques catalytiquement inactives (RNase 9-13) (Koczera et al., 2016; H. Y. Liu et al., 2018; Schwartz et al., 2018; Sun et al., 2022). Chez l'humain, tous les gènes des RNases sont regroupés sur le chromosome 14. Les huit membres canoniques (RNase 1-8) partagent 40% de leur séquence génétique, tandis que les RNase 9-13 ne présentent qu'une identité de séquence de 15 à 30% avec les RNases canoniques (Cho et al., 2005). Il est à noter que les RNases 9-13 ne conservent pas les résidus catalytiques,

entraînant l'absence de l'activité catalytique présente chez les RNases canoniques (Goo & Cho, 2013).



**Figure 1.1 Structure de la RNase A.** Le repliement de l'enzyme est formé par deux domaines opposés, appelés V1 (bleu) et V2 (rouge), séparés par une région charnière (verte). La triade catalytique composée de H12, H119 et K41 est représentée en jaune (Protein Data Bank : 5OLD). Figure créée à l'aide de PyMOL Open-Source Build Version 2.5.0 (Schrödinger, LLC.).

Les huit membres canoniques comprennent hRNase 1 (RNase pancréatique), hRNase 2 (neurotoxine dérivée des éosinophiles, EDN), hRNase 3 (protéine cationique des éosinophiles, ECP), hRNase 4 ; hRNase 5 (angiogénine, hANG), hRNase 6 (RNase k6), hRNase 7 et hRNase 8 (Sorrentino, 2010; Sun et al., 2022). Sur le plan structural, les RNases canoniques partagent toutes un repliement tertiaire conservé, connu sous le nom de repliement de type "thiorédoxine" (Kelemen et al., 1999). Sept des huit ribonucléases ont une structure tertiaire stable avec quatre liaisons disulfures formées par huit résidus cystéine conservés. En revanche, la RNase 5 (hANG) possède six résidus cystéine et subit une maturation avec trois liaisons disulfure (Lee et al., 2019; Zhang et al., 2003). Ces RNases partagent toutes la caractéristique d'être codées par des gènes avec un module catalytique conservé (CKxxNTF). L'activité catalytique de ces RNases est déterminée par deux résidus histidine et un résidu lysine, ce dernier étant situé dans le motif de séquence conservé CKxxNTF (Figure 1.2). Chaque RNase contient initialement à l'extrémité N-terminale une séquence de 20 à 28 acides aminés qui contrôle le processus de synthèse et de sécrétion des protéines, suivie d'un peptide mature composé d'environ 130 acides aminés (Koczera et al., 2016; Schwartz et al., 2018). Les études de divergence des espèces ont révélé que la superfamille des ptRNases provient du gène RNase 5 et s'est étendue au cours de l'évolution des mammifères (Dyer & Rosenberg, 2006). Cela implique que ces RNases partagent



RNase 5 (NCBI : NP\_001372202.1), RNase 6 (NCBI : NP\_005606.1), RNase 7 (NCBI : NP\_115961.3) et RNase 8 (NCBI : NP\_612204.1). L'alignement a été généré à l'aide de CLUSTAL Omega et affiché à l'aide d'ESPrpt 3.0.

**B.** Alignement structural montrant les modèles en ruban 3D de RNase 1 (PDB : 1DZA), RNase 2 (PDB : 1GQV), RNase 3 (PDB : 1QMT), RNase 4 (PDB : 1RNF), RNase 5 (PDB : 1B1I), RNase 6 (PDB : 6MV6) et RNase 7 (PDB : 2HKY). Les résidus de la triade catalytique (histidine, histidine et lysine) sont étiquetés selon la numérotation de la RNase 5 et sont représentés sous forme de bâtonnets. Bien qu'un modèle AlphaFold2 existe, la structure 3D expérimentale de la RNase 8 (UniProt : Q8TDE3) n'a jamais été résolue et n'est pas disponible dans la PDB. Figure créée à l'aide de PyMol Open-Source Build Version 2.5.0 (Schrödinger, LLC.)

Les membres de la superfamille des ptRNases jouent un rôle essentiel dans divers processus biologiques (Lee et al., 2019). Ils possèdent notamment des activités cytotoxiques, antihelminthiques, des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques et immunorégulatrices, ainsi qu'une neurotoxicité, une promotion de la prolifération cellulaire, des effets anti-apoptotiques et de régulation du métabolisme de l'ARN à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (Lee et al., 2019; Lu et al., 2018; Sun et al., 2022). En ce sens, le Tableau 1.1 résume quelques études cliniques et analyses sur des modèles de maladies animales suggérant leur implication significative dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques.

**Tableau 1.1 Résumé des activités biologiques des huit RNases humaines canoniques et des pathologies associées** (Lee et al., 2019; Sun et al., 2022)

RNase	Profil d'expression (organes/cellules)	Fonctions biologiques		
		Dépendante de l'activité catalytique	Indépendante de l'activité catalytique	Exigence de l'activité catalytique indéfinie
hRNase 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pancréas, poumons, estomac, testicules</li> <li>• Cellules endothéliales, cellules acineuses, oligodendrocytes, entérocytes</li> <li>• Dégradation des ARNex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dégradation des ARNex</li> </ul>	n/a	n/a
hRNase 2 /EDN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moelle</li> <li>• Neutrophiles, cellules dendritiques, monocytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antivirale</li> </ul>	n/a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité chimiotactique</li> </ul>
hRNase 3 /ECP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moelle</li> <li>• Neutrophiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antivirale</li> <li>• Activité antihelminthique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• activité antibactérienne</li> <li>• activité cytotoxique</li> </ul>	n/a
hRNase 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Foie, pancréas, intestin, ovaire</li> <li>• Fibroblastes, microglies, macrophages, kératinocytes.</li> </ul>	n/a	n/a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité neuroprotectrice</li> </ul>

hRNase 5 /hANG	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Foie, pancréas, intestin, estomac</li> <li>• Microglies, macrophages, hépatocytes, fibroblastes</li> <li>• Cellules cancéreuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité angiogénique</li> <li>• Dégradation de l'ARNr</li> <li>• Clivage de l'ARNt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liaison EGFR</li> <li>• Activation de la signalisation EGFR</li> <li>• EMT</li> <li>• Liaison plexine-B2</li> <li>• Transcription d'ARNr</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité neuroprotectrice</li> <li>• Transcription d'ARNm</li> </ul>
hRNase 6 /k6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganglion lymphatique, rate, vésicule biliaire, vessie urinaire</li> <li>• Macrophages, cellules dendritiques, cellules B, cellules dendritiques plasmacytoïdes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antivirale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antibactérienne</li> <li>• Activité anti-microbienne</li> </ul>	n/a
hRNase 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Œsophage, peau, vésicule biliaire</li> <li>• Kératinocytes, tissus/cellules épithéliales</li> </ul>	n/a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antibactérienne</li> <li>• Activité anti-microbienne</li> <li>• Activité antifongique</li> </ul>	n/a
hRNase 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placenta, poumons, rate et testicules</li> <li>• Aucune donnée sur les types de cellules</li> </ul>	n/a	n/a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité anti-microbienne</li> </ul>

## 1.2 RNase 5 humaine, ou angiogénine (hANG)

### 1.2.1 Aperçu de la structure de la RNase 5 et de son activité catalytique

La RNase 5 humaine, également connue sous le nom d'angiogénine (hANG), est l'un des huit membres canoniques de la RNase chez l'humain, qui peut cliver l'ARN simple brin. Cette protéine monomérique de 14 kDa a été isolée pour la première fois à partir du surnageant sans sérum de la lignée cellulaire de carcinome humain HT-29. Elle a été identifiée pour la première fois comme un facteur angiogénique en 1985 par Fett et al. (Fett et al., 1985). hANG est le seul membre de la superfamille des ptRNases à présenter une activité angiogénique, en plus du seul facteur angiogénique à présenter une activité ribonucléolytique. En 1986, la structure 3D préliminaire de hANG a été décrite pour la première fois par Palmer et al. sur la base de son homologie avec la RNase A pancréatique bovine (Palmer et al., 1986). Notamment, hANG partage 33% d'identité de séquence, 65% d'homologie et la même triade catalytique que la RNase A (Palmer et al., 1986; Sheng & Xu, 2016). En 1994, Acharya et al. ont utilisé la cristallographie aux rayons X et l'analyse structurale pour élucider la structure tridimensionnelle de hANG, apportant de nouvelles informations sur la structure de cette enzyme (Acharya et al., 1994). La structure 3D de hANG est en forme de rein, ressemblant à celle de tous les membres de la famille des ptRNases (Figure 1.3A). Elle se compose de sept brins  $\beta$ , de trois hélices  $\alpha$  et d'une hélice  $3_{10}$ . En particulier, les brins  $\beta$  jouent un rôle crucial dans la formation de son noyau central, qui se compose d'une structure en P avec une paire torsadée de deux brins  $\beta$  centraux ( $\beta 3$ -  $\beta 4$ , résidus 69-84 et  $\beta 5$ -  $\beta 6$ , résidus 93-108) et deux brins supplémentaires ( $\beta 1$ , résidus 41-47 et  $\beta 7$ , résidus 111-116) (Figure 1.3B). Le brin  $\beta 2$  (résidus 62-65) forme un brin court supplémentaire sur un côté de l'échafaudage central. Pendant ce temps, l'hélice H1 (résidus 3-14 à l'extrémité N-terminale) est subordonnée à une hélice  $3_{10}$  (résidus 117-121 à l'extrémité C-terminale). Les hélices 2 ( $\alpha 2$ , résidus 22-33) et 3 ( $\alpha 3$ , résidus 49-58) sont reliées par le brin  $\beta 1$  et orientées à un angle de  $70^\circ$  par rapport au plan du feuillet  $\beta$  de chaque côté de la structure du squelette (Figure 1.3 B). Les autres résidus forment des structures en boucle (Acharya et al., 1994). Principalement, la triade catalytique (H13, K40 et H114), ainsi que les résidus catalytiques généraux de hANG, ressemblent à ceux trouvés dans la RNase A bovine, qui est capable de cliver les liaisons phosphodiesters de l'ARN simple brin (Acharya et al., 1994). De plus, grâce à des études structurales et biochimiques, il a été observé que hANG avait évolué trois sites fonctionnels distincts : la triade catalytique (Acharya et al., 1994; Curran et al., 1993), une séquence de localisation nucléaire (Moroianu & Riordan, 1994a) et un site de liaison cellulaire (Hallahan et al., 1991, 1992; Hu et al., 1991).

### 1.2.1.1 Site catalytique

Comme tous les membres de la superfamille des ptRNases, hANG présente des positions catalytiques spécifiques pour le clivage de l'ARN à l'extrémité 3' des nucléotides pyrimidiques. Les bases pyrimidiques se lient préférentiellement au sous-site B1, alors que la liaison phosphodiester adjacente étant clivée s'associe à P1, tandis que les bases puriques interagissent avec le sous-site B2 (Sultana et al., 2022). Par mutagenèse dirigée, il a été démontré que le site de liaison des pyrimidines (B1) de hANG est entravé par Q117 (Leonidas et al., 1999). De plus, une liaison hydrogène entre T44 et T80 obstrue le site pyrimidique. Par conséquent, des mutations dans le site actif pourraient augmenter considérablement son activité (Russo et al., 1994).

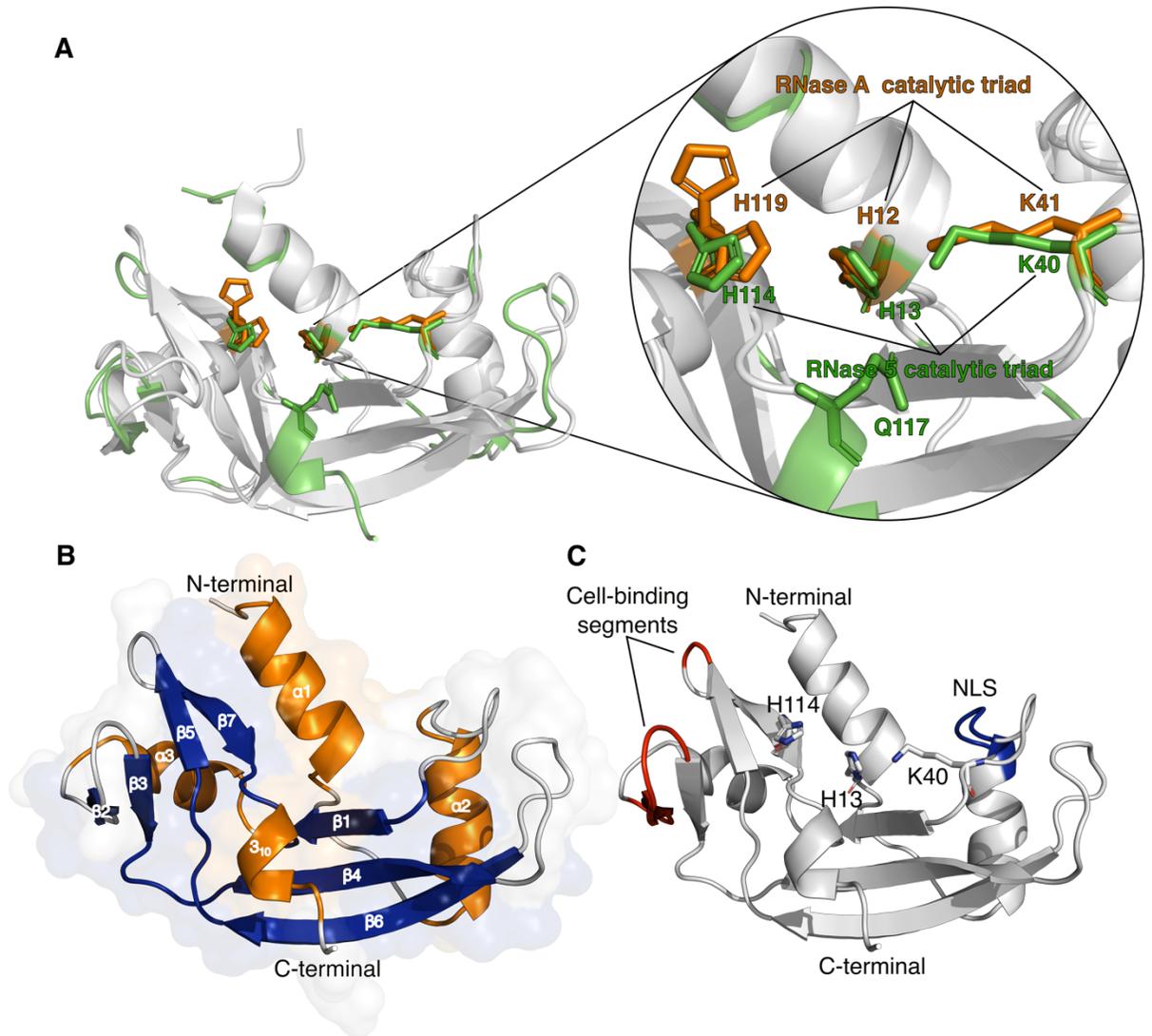
Contrairement aux quatre ponts disulfures trouvés chez les autres membres de la superfamille des ptRNases, hANG n'en présente que trois. Ces différences structurales, ainsi que le site actif bloqué par Q117 (Figure 1.3 A), impliquent que ces variations de forme constituent une partie essentielle de son mécanisme d'action biologique (Acharya et al., 1995). En conséquence, l'activité ribonucléolytique de l'angiogénine serait  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  fois inférieure à celle de la RNase A (Leland et al., 2002; Shapiro et al., 1986). Bien que son activité ribonucléolytique soit plus faible, elle semble néanmoins essentielle à la préservation de sa fonction angiogénique (Shapiro et al., 1986). Bien que plusieurs substrats d'ARN communs tels que le Poly(C), le Poly(U), l'ARN de levure ou de germe de blé ne soient pas efficacement clivés par hANG *in vitro* (Shapiro et al., 1986), l'enzyme montre encore des préférences de spécificité envers CpA>CpG>UpA>UpG (Harper & Vallee, 1989; Russo et al., 1996; Shapiro et al., 1986). hANG semble également présenter une plus grande sélectivité de clivage que la RNase A (Lyons et al., 2017). Contrairement à la RNase A, qui catalyse principalement le clivage de l'ARN après les résidus pyrimidiques (Kelemen et al., 2000), hANG clive généralement l'extrémité 3' des résidus d'acide cytidylique ou uridylique lorsque l'adénine suit une pyrimidine, mais elle n'est pas limitée à tous les sites de clivage potentiels (Sheng & Xu, 2016). Il a été également démontré que hANG digère les ARNr 28S et 18S dans les cellules cancéreuses HT-29, produisant ainsi des fragments de 100 à 500 nucléotides (Shapiro & Vallee, 1987). Les premiers résultats expérimentaux *in vitro* suggéraient d'ailleurs que hANG pourrait possiblement inhiber la synthèse protéique en raison du clivage de l'ARNt, alors que la stabilité des autres ARNr et ARNm analysés n'a pas été affectée (Saxena et al., 1992).

Des études *in vitro* plus récentes utilisant l'ARN total de cellules HEK293 ont également montré que hANG pouvait cliver efficacement les ARNt et d'autres petits ARN à des sites spécifiques, comme les ARNsn (Z. Li et al., 2012). De plus, l'analyse de mutation de l'ARNt (ARNtLys) a révélé

que des substitutions nucléotidiques spécifiques dans l'ARNt peuvent affecter le clivage de l'ARNt médié par hANG *in vitro* (Z. Li et al., 2012). En fait, il a été suggéré que le clivage d'ARNt par hANG pourrait générer de long ARN non-codants pouvant être impliqués à leur tour dans la modulation de divers mécanismes cellulaires (Lyons et al., 2017).

#### 1.2.1.2 Segments de liaison cellulaire

Au début des années 1990, des études ont rapporté que hANG possédait un site non-catalytique englobant les résidus 60-68 ainsi que l'Asn109, qui s'avère un site important pour la liaison à la surface cellulaire endothéliale (Figure 1.3 C). Des études de mutagenèse ont d'ailleurs suggéré que les résidus au sein de ces segments de liaison cellulaire jouent un rôle important dans l'activité angiogénique de hANG (Hallahan et al., 1991, 1992; Shapiro & Vallee, 1992). Les segments de liaison cellulaire et le site catalytique de hANG ont été montrés pour agir de manière synergique afin de préserver son activité angiogénique (Raines et al., 1995). En effet, en 1995, Raines et al. ont démontré l'importance de résidus spécifiques dans l'activité angiogénique de hANG. Ils y sont parvenus en créant une protéine hybride entre hANG et la RNase A, qui est dépourvue d'activité angiogénique. La protéine hybride (RNase A/hANG) composée de 13 résidus de hANG (résidus 58-70) substitués par les 15 résidus analogues retrouvés chez la RNase A (résidus 59-73) a démontré promouvoir l'angiogénèse chez la souris à un taux similaire à celui de hANG de type sauvage. De plus, un peptide de conception correspondant à cette boucle de surface de 13 résidus chez hANG (résidus 58-70) pouvait inhiber l'angiogénèse endogène chez la souris. Par ailleurs, les segments de liaison cellulaire ont également été indiqués comme étant essentiels pour la translocation nucléaire de hANG (Iyer et al., 2013). Ces résultats supportent un modèle dans lequel à la fois les segments de liaison cellulaire et le site catalytique sont nécessaires pour promouvoir l'angiogénèse par hANG.



**Figure 1.3 Structure tridimensionnelle de l'angiogénine humaine (hANG, RNase 5).** **A.** Superposition structurale entre hANG et la RNase A bovine, illustrant le résidu Q117 qui obstrue le site actif de hANG. La RNase A n'a pas de résidu structurellement équivalent à Q117. **B.** Image illustrant la séquence et la structure protéique de hANG, mettant en évidence la forme de rein composée de sept brins  $\beta$ , de trois hélices  $\alpha$  et d'une hélice  $3_{10}$ . **C.** Image illustrant la séquence et la structure protéique de hANG, mettant en évidence le segment de liaison cellulaire précédemment proposé (en rouge, résidus K60 à N68 (Hallahan et al., 1991) ; et N109 (Hallahan et al., 1992), le signal de localisation nucléaire (en bleu foncé, résidus R31 à G35 (Moroianu & Riordan, 1994a) et la triade catalytique (Acharya et al., 1994) (H13, K40, H114 ; mis en évidence en bâtonnets). Figure créée à l'aide de PyMol Open-Source Build Version 2.5.0 (Schrödinger, LLC.)

### *1.2.1.3 Signal de localisation nucléaire (NLS)*

En plus des segments de liaison cellulaire, hANG possède également une séquence essentielle pour sa translocation nucléaire, appelée le signal de localisation nucléaire (NLS) (Figure 1.3 C) (Jans et al., 2000; Moroianu & Riordan, 1994a, 1994b). Dans ces études, trois arginines consécutives <sup>31</sup>RRR<sup>33</sup> ont été identifiées comme des acides aminés importants pour le NLS chez hANG. Par la suite, Lixin et al. ont indiqué que l'import nucléaire de hANG était différent de la voie d'import nucléaire conventionnelle via le récepteur d'importine et Ran (Lixin et al., 2001). hANG utiliserait un mécanisme d'import nucléaire unique avec son propre NLS pour cibler le noyau de manière indépendante. Plus précisément, le NLS de hANG peut se lier aux composants nucléaires, ce qui semble être essentiel pour l'accumulation nucléaire. Cela se distingue de l'import de protéines nucléaires médiées par le NLS conventionnel, où la liaison intranucléaire n'est pas intégrale au processus de transport (Lixin et al., 2001). En résumé, hANG possède une structure unique composée de trois régions de fonctions exclusives connues : les résidus catalytiques caractéristiques de la réaction de transphosphorylation de l'ARN retrouvés dans la superfamille des ptRNases, les segments de liaison cellulaire et le signal de localisation nucléaire, chacun d'entre eux étant essentiel à ses fonctions biologiques.

## **1.2.2 Mécanismes d'action de hANG**

Plusieurs études suggèrent que hANG joue un rôle essentiel dans les voies de signalisation intracellulaires (Figure 1.4). Dans cette section, nous donnerons un aperçu des récepteurs responsables de l'endocytose de hANG, de la voie de signalisation qui s'active lors de la liaison de hANG et des voies de signalisation intracellulaires dans lesquelles hANG est impliquée après avoir subi l'endocytose.

### *1.2.2.1 Endocytose médiée par les récepteurs*

Il est connu que hANG sécrétée pénètre dans la cellule et finit par s'accumuler dans le noyau, possiblement par endocytose des récepteurs. Cette internalisation de hANG est essentielle à son activité angiogénique dans les cellules endothéliales et à son effet mitogène sur différents types de cellules (Kishimoto et al., 2005; Tsuji et al., 2005; Yoshioka et al., 2006). Deux récepteurs d'endocytose de hANG ont été identifiés : le syndécane-4 (Skorupa et al., 2012) et la protéine réceptrice de 170 kDa (Hu et al., 1997). Le syndécane-4 est un protéoglycane d'héparane sulfate à la surface des cellules qui s'ancre à la surface des astrocytes et est exprimé à la fois par les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales (Couchman, 2003; Echtermeyer et al., 2001;

Simons & Horowitz, 2001). On sait que hANG interagit avec les résidus d'héparane sulfate sur le syndécane-4, c'est-à-dire que les motifs <sup>31</sup>RRR<sup>33</sup> et <sup>50</sup>KRSIK<sup>54</sup> de hANG ont été montrés comme étant impliqués dans la liaison à l'héparine (Soncin et al., 1997; Yeo et al., 2016). L'élimination de l'héparane sulfate du récepteur par un traitement à l'héparinase réduit les niveaux d'internalisation de hANG (Skorupa et al., 2012). De même, l'héparine, un glucide très similaire à l'héparane sulfate, peut bloquer l'endocytose de hANG en concurrençant le site de liaison du récepteur à l'héparane sulfate normalement ciblé par hANG (Joo Yeo et al., 2014). Ces résultats indiquent que le syndécane-4 favorise l'endocytose de hANG. L'identification de la protéine réceptrice de 170 kDa pour hANG a donné des résultats contradictoires. Cependant, les résultats expérimentaux disponibles indiquent qu'elle fonctionne probablement comme une molécule de signalisation intracellulaire plutôt que d'être impliquée dans l'endocytose (Y. N. Wang et al., 2018; Yu et al., 2017).

#### *1.2.2.2 hANG extracellulaire active des voies de transduction du signal*

Dans l'environnement extracellulaire, hANG sécrétée peut déclencher une cascade de réponses de signalisation en se liant à son récepteur, une protéine réceptrice de 170 kDa qui n'a pas encore été entièrement caractérisée. Comme décrit dans la section précédente, les analyses de la protéine putative réceptrice de 170 kDa ont donné des résultats contradictoires. Pour donner un aperçu des voies de signalisation intracellulaire de hANG, nous avons examiné la littérature et compilé des résultats cohérents qui offrent la perspective globale la plus solide concernant son activité intracellulaire. Ces voies sont résumées dans la Figure 1.4.

Yu et al. (2017) ont isolé des récepteurs putatifs en utilisant la chromatographie d'affinité sur hANG et ont conclu que le récepteur cellulaire de hANG pourrait être Plexine-B2 (PLXNB2). Il a été montré que PLXNB2 agit comme un récepteur essentiel pour la liaison de hANG à la surface cellulaire des cellules cibles (Yu et al., 2017). Le site de liaison de PLXNB2 sur hANG serait une région en boucle (<sup>60</sup>KNGNPHREN<sup>68</sup>), qui a été identifiée comme un segment de liaison cellulaire (Sheng & Xu, 2016; Yu et al., 2017). PLXNB2 serait un récepteur fonctionnel de hANG qui médie l'induction de multiples voies de signalisation intracellulaire (ERK1/2, PKB/Akt, SAPK/JNK) dans diverses cellules cibles (Yu et al., 2017). L'activation de ce signal favoriserait la traduction des protéines ribosomiques, agirait comme une étape essentielle dans la biogenèse des ribosomes et stimulerait l'angiogenèse en régulant les ensembles de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la croissance cellulaire et l'activité régénératrice (Yu et al., 2017). L'axe hANG/PLXNB2 jouerait donc un rôle essentiel dans divers processus physiologiques et pathologiques associés à la fonctionnalité de hANG (Bai et al., 2020; S. Li et al., 2020; X. Liu et al., 2021).

Dans un autre rapport, Wang et al. (2018) ont suggéré que la protéine réceptrice de 170 kDa pourrait être le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), un membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (Y. N. Wang et al., 2018). hANG sécrétée par les cellules endothéliales pourrait se lier à l'EGFR et activer la signalisation de l'EGFR dans les cellules adénocarcinomeuses pancréatiques (PDAC). hANG pourrait également agir comme un ligand indépendant de l'EGFR avec son activité enzymatique activant la voie de signalisation PI3K/Akt qui régule positivement l'expression de hANG dans les cellules tumorales (Wang et al., 2018). De plus, Dutta et al. (2014) ont rapporté que hANG interagirait avec le système activateur du plasminogène (SAP) à la surface cellulaire des cellules cancéreuses du sein pour réguler la formation de plasmine et la migration cellulaire par la phosphorylation de FAK et la kinase Src cellulaire (Dutta et al., 2014).

En général, il a été rapporté que hANG active des voies de signalisation pour stimuler la croissance cellulaire, comme les kinases ERK1/2 (Miyake et al., 2015), B/Akt (H. M. Kim et al., 2007; Shu et al., 2015) et SAPK/JNK dans différentes cellules cibles. hANG peut activer la voie de survie cellulaire médiée par NF- $\kappa$ B et la voie anti-cancer médiée par Bcl-2 (Sadagopan et al., 2012; Xia et al., 2015). hANG peut également activer l'activité de la nitric oxide synthase (NOS) indépendamment de son activité RNase. NOS est connu comme un médiateur biologique impliqué dans la physiologie vasculaire (Trouillon et al., 2011). Cette activation est médiée par la cascade de transduction du signal PI3K/Akt documentée dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et dans les cellules endothéliales dérivées de cellules souches embryonnaires (Trouillon et al., 2010). Parallèlement à cela, hANG pourrait activer une variété de voies de signalisation dans différentes cellules et dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Cependant, son action est principalement liée à la prolifération, la migration et l'angiogenèse cellulaire dans la littérature.

### *1.2.2.3 Interactions notables de hANG avec d'autres protéines*

#### L'inhibiteur de ribonucléase (RI) interagit et module la fonction de hANG

La première protéine se liant à ANG identifiée était l'inhibiteur de ribonucléase (RI) du placenta humain, une protéine à répétitions riches en leucine de 50 kDa (Shapiro & Vallee, 1987). L'interaction entre hANG et RI est extrêmement forte, avec une valeur de  $K_i$  extrêmement faible de 0,7 fM (F. S. Lee et al., 1989). L'interface de liaison a été identifiée comme étant composée d'une large surface de contact entre les deux protéines, constituée des résidus 434-460 de l'extrémité C-terminale de RI et de la poche catalytique ribonucléolytique active de hANG (Papageorgiou et al., 1997). La liaison de RI inhibe à la fois l'activité angiogénique et catalytique

de hANG (Shapiro & Vallee, 1987). RI se lie à l'hANG cellulaire, ce qui empêche le clivage aléatoire de l'ARN intracellulaire. Il a été également rapporté que RI régule la localisation subcellulaire de hANG pour contrôler la croissance et la survie (Pizzo et al., 2013). Dans le cytoplasme, la majeure partie de hANG est maintenue inactive via des interactions avec RI. Lorsqu'un stress se produit, la concentration cytoplasmique de hANG actif augmente, ce qui conduit à la dissociation du complexe ANG-RI, à la translocation nucléaire de hANG et à l'induction de la transcription de hANG (Lyons et al., 2017).

#### hANG interagit avec l'actine

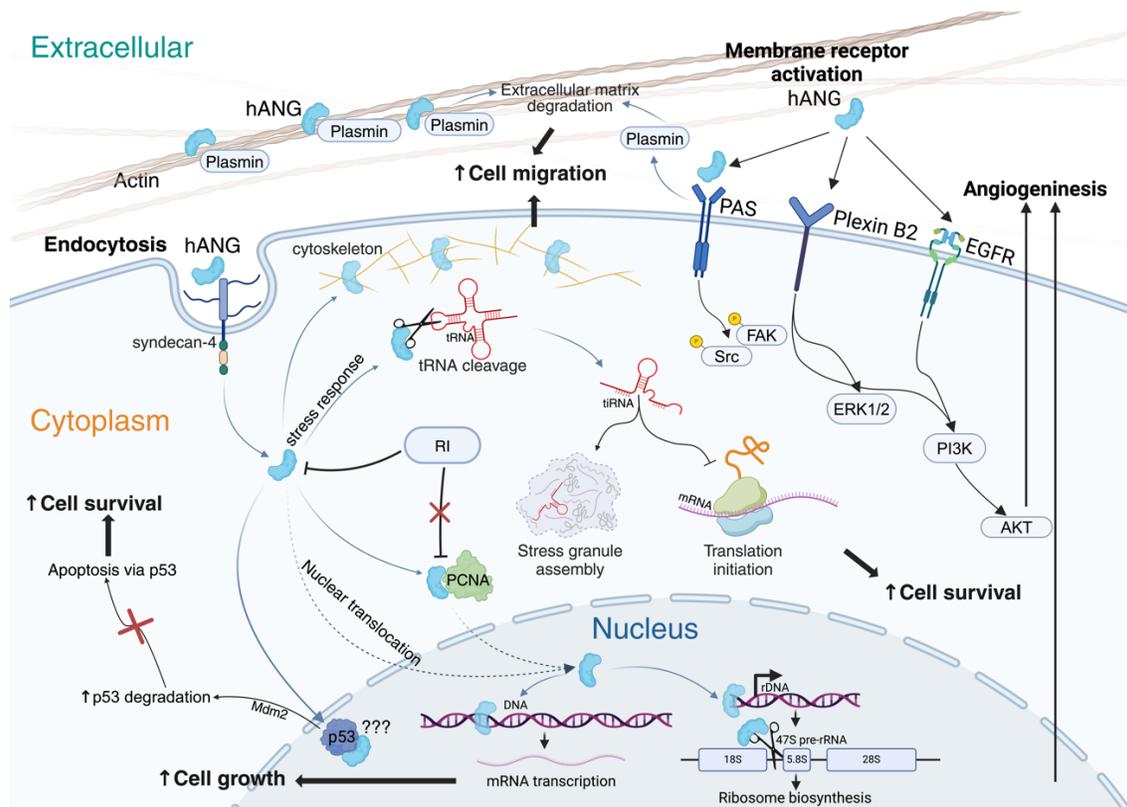
Il a été démontré que hANG interagirait avec l'actine, ce qui stimulerait l'invasion des cellules endothéliales (Hu et al., 1991, 1993). Cette liaison de hANG à l'actine se produirait via les résidus 60 à 68, qui sont connus comme faisant partie de ses segments de liaison cellulaire (comme décrit dans la section 1.2.1). Dans le microenvironnement tumoral, cette interaction servirait d'activation du plasminogène tissulaire, qui à son tour stimule la formation de plasmine (Hu & Riordan, 1993; Raghu et al., 2010). La plasmine se combine ensuite avec diverses métalloprotéinases, détruisant la lamine et la fibronectine de la membrane basale (Hu et al., 1994). De plus, après avoir interagi avec l'actine à la surface cellulaire, hANG provoque également l'inhibition de la polymérisation de l'actine G et induit des changements dans les propriétés physiques de l'actine F, entraînant ainsi des modifications du cytosquelette (Pyatibratov et al., 2010; Pyatibratov & Kostyukova, 2012). La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire modifie considérablement la structure et la fonction des cellules, ainsi que la morphologie des tissus. Ces événements sont considérés comme nécessaires à la migration des cellules endothéliales lors de la néovascularisation (Wei et al., 2011; Weng, Dong, Mao, et al., 2022).

#### hANG interagit avec p53

Certaines indications mettent en lumière la capacité de hANG à induire l'inactivation de p53 par une interaction protéine-protéine directe (Sadagopan et al., 2012). hANG empêche la phosphorylation de la sérine 15 de p53, un événement clé pour favoriser l'association de p53 avec Mdm2. Mdm2 est connu pour réguler la dégradation de p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Des observations ont montré que la dégradation de p53 augmente avec hANG, suggérant que ses fonctions anti-apoptotiques et de survie cellulaire peuvent être liées à l'inactivation des fonctions de p53 (Sadagopan et al., 2012). Il est intéressant de noter que les motifs NLS de hANG seraient également impliqués dans l'interaction entre hANG et p53, liant la présence de la protéine au noyau et la régulation de voies de signalisation via p53 (Yeo et al., 2017).

## hANG interagit avec l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA)

L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) est une protéine jouant un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN et les facteurs associés dans les cellules en division active. En tant qu'anneau homotrimérique, PCNA forme une pince coulissante qui aide à la réplication de l'ADN en fournissant une plateforme pour les facteurs liés à la réplication (Krishna et al., 1994; Moldovan et al., 2007). Les modifications post-traductionnelles de PCNA sont cruciales dans la transcription de l'ADN (Leung et al., 2019). PCNA améliore la réplication en augmentant l'affinité de la polymérase pour les matrices d'ADN et agit comme un facteur de processivité (Boehm et al., 2016; Moldovan et al., 2007). De plus, PCNA agit dans la régulation du cycle cellulaire et des taux de prolifération, ce qui en fait un biomarqueur potentiel (Moldovan et al., 2007). Des études suggèrent que PCNA est un centre d'assemblage qui aide à la réplication et au maintien du génome chez les eucaryotes (D. Yang et al., 2023). En tant que composant essentiel du réplisome et indicateur de la progression du cycle cellulaire, PCNA joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité génomique des générations cellulaires.



**Figure 1.4 Aperçu du mécanisme intracellulaire et des voies de signalisation auxquelles participe hANG.** Figure composée à partir des données des articles (Chatzileontiadou et al., 2017; Ferguson & Subramanian, 2018; Garnett & Raines, 2022; Kishikawa et al., 2008; Monti et al., 2009; Papageorgiou et al., 1997; Rashad et al., 2020; Sadagopan et al., 2012; Yu et al., 2017). Figure créée à l'aide de BioRender.com.

Des études récentes ont mis en évidence l'interaction entre PCNA et hANG. Chatzileontiadou et al. (2017) ont utilisé une analyse protéomique combinée à la spectrométrie de masse couplée à une immunoprécipitation sur des extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules cancéreuses EA.hy926. Ils ont montré que hANG interagit avec PCNA dans le cytoplasme, mais pas dans le noyau, où PCNA est généralement présent (Chatzileontiadou et al., 2017). De plus, Papaioannou et al. (2023) ont élucidé les propriétés structurales et biochimiques de cette interaction en utilisant la RMN et l'ITC. Ils ont découvert que la liaison hANG-PCNA est assez forte, avec une valeur de  $K_D$  de 126 nM (Papaioannou et al., 2023). Le modèle proposé de formation du complexe hANG-PCNA montre une interface impliquant les résidus hANG des positions du site actif P1 (His13 et Lys40), B1 (Leu115) et P2 (His8), ainsi que des résidus des régions C-terminales Arg122 et Pro123. Ainsi, la liaison de hANG à PCNA semble bloquer à la fois le site actif et les segments de liaison cellulaire de hANG, mais n'entrave pas sa séquence NLS (<sup>31</sup>RRRGL<sup>35</sup>) (Papaioannou et al., 2023). Ces résultats suggèrent que, une fois que l'internalisation de hANG dans la cellule se produit par endocytose, il peut éviter la RI en se liant à PCNA. Cette interaction libère la séquence NLS de hANG, lui permettant de se lier à des protéines cargos et de se transloquer dans le noyau cellulaire, où hANG stimule la transcription de l'ADNr.

#### *1.2.2.4 hANG agit comme une épée à double tranchant dans la régulation de la traduction*

##### hANG stimule la transcription de l'ADNr dans le nucléole

hANG joue un rôle important dans la prolifération cellulaire en modulant la transcription de l'ARNr par différents mécanismes. Son signal de localisation nucléaire lui permet d'entrer dans le nucléole (Moroianu & Riordan, 1994b), où il clive l'ARN associé au promoteur (ARNp) (Hoang & Raines, 2017), qui se lie généralement au promoteur de l'ADNr pour réprimer la transcription. En dégradant le ARNp, hANG réprime la transcription de l'ADNr et active la production d'ARNr, stimulant la biogenèse des ribosomes et la synthèse des protéines pour favoriser la croissance cellulaire (Tsuji et al., 2005). Dans les cellules, hANG interagit également directement avec le suppresseur de tumeur p53, inhibant la phosphorylation de p53 à S15 pour favoriser la dégradation de p53 par liaison à Mdm2 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Sadagopan et al., 2012). Cela permet les activités anti-apoptotiques de hANG et favorise la survie cellulaire. Dans le nucléole, hANG stimule la transcription de l'ADNr en se liant à l'élément promoteur de l'ADNr (Xu et al., 2003) et en modulant les marqueurs épigénétiques (Sheng et al., 2014), la production accrue d'ARNr étant essentielle pour les effets prolifératifs et angiogéniques (Kishimoto et al., 2005; Moroianu & Riordan, 1994b). Grâce à des voies impliquant à la fois l'inhibition de p53 et le clivage de l'ARNp, hANG régule précisément les niveaux d'ARNr et

participe au traitement du pré-ARNr 47S (Monti et al., 2009) pour favoriser la prolifération cellulaire via de multiples mécanismes ciblés dans le nucléole et le cytoplasme.

#### hANG clive l'ARNt dans le cytoplasme en conditions de stress

Divers facteurs environnementaux, notamment le stress, peuvent perturber l'homéostasie cellulaire, ce qui permet aux cellules mammifères de reprogrammer leur traduction des protéines et de survivre dans des conditions défavorables (Thompson et al., 2008). Un mécanisme impliqué dans ce processus est l'hydrolyse de l'ARNt induite par le stress, qui a été observée pour la première fois chez *Tetrahymena thermophila* puis découverte chez les bactéries, les champignons et les cellules mammifères (Yamasaki et al., 2009). La synthèse des protéines consomme beaucoup d'énergie, ce qui explique pourquoi les cellules eucaryotes régulent à la hausse les voies de réponse intégrée au stress en cas de stress chronique. Ceci permet de réorienter la transcription et la traduction vers les gènes liés au stress pour favoriser la survie (Fu et al., 2009). Un élément régulateur essentiel dans le processus de réorientation est l'inhibition globale de la traduction, qui peut être obtenue par le clivage de l'ARNt. Les ARNt jouent un rôle essentiel dans la synthèse des protéines en agissant comme des adaptateurs pour la reconnaissance des codons de l'ARNm et des transporteurs d'acides aminés vers les ribosomes (Fu et al., 2009). Les fragments d'ARNt induits par le stress semblent réprimer directement la synthèse des protéines par divers mécanismes. Certaines observations incluent l'inhibition de la traduction *in vitro* et l'induction de l'assemblage des granules de stress (Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011).

hANG est une endoribonucléase capable de cliver l'ARNt à l'intérieur des cellules. Curieusement, l'ARNt a été utilisé pour quantifier hANG (F. S. Lee & Vallee, 1989). L'expression de hANG est généralement faible dans les cellules normales, mais peut augmenter significativement en réponse au stress cellulaire (Shapiro & Vallee, 1987). Dans des conditions normales, hANG est inactive à l'intérieur des cellules en raison de sa liaison à haute affinité avec RI, un inhibiteur de RNase (Shapiro & Vallee, 1987). Cependant, en cas de stress, hANG est activée par dissociation de RI déclenchée par l'état de stress (Pizzo et al., 2013). Ensuite, hANG active l'hydrolyse de la boucle anticodon de l'ARNt ou de la région terminale 3'-CCA pour produire de petits fragments d'ARN appelés ARNtis (Fu et al., 2009; Rashad et al., 2020; Yamasaki et al., 2009). On pense que les ARNtis sont utilisés par les cellules comme moyen de réguler la traduction en réponse à des stress tels que le stress oxydatif, l'hypoxie et la privation de nutriments. Le clivage de l'ARNt par hANG dans des conditions de stress entraîne une répression traductionnelle globale en séquestrant les ARNm dans les granules de stress, tout en permettant la traduction des ARNm

des gènes anti-apoptotiques (Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011). Des études ont montré que les ARNtis générés par le clivage de l'ARNt initiée par hANG peuvent inhiber la traduction en interférant avec le complexe eIF4F et entravant l'initiation de la traduction (Yamasaki et al., 2009). De plus, certains ARNtis peuvent se lier à la protéine YB-1 pour contribuer à l'assemblage des granules de stress cellulaire (Ivanov et al., 2011). Cette interaction met en évidence la relation critique entre hANG et ARNti dans la régulation adaptative de la traduction en réponse au stress. L'activation de la biogenèse des ARNtis par hANG semble jouer un rôle central dans le contrôle de la production de protéines lorsque les cellules sont confrontées à des stress (Pizzo et al., 2013; Saikia et al., 2012; Schaefer et al., 2010). Dans l'ensemble, hANG et les ARNtis induits par le stress fonctionnent étroitement pour moduler la réponse au stress et les voies de survie en affectant la traduction (Akiyama et al., 2022; Goncalves et al., 2016). Le métabolisme de l'ARNt médié par hANG dans le cytoplasme est crucial pour la survie et le développement et la progression des cellules cancéreuses (Razavi et al., 2021).

### **1.3 L'angiogénine (hANG) et les conditions pathologiques associées**

Compte tenu du rôle central que joue hANG dans de nombreux processus cellulaires, il n'est guère surprenant que des perturbations de ces mécanismes puissent avoir des répercussions pathologiques significatives. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence les liens étroits entre hANG et divers dérèglements cellulaires, notamment dans les domaines de l'oncologie et des maladies neurodégénératives. En oncologie, des études ont suggéré l'implication de hANG dans la progression tumorale et le développement de cancers. Des niveaux élevés de hANG ont été associés à une prolifération cellulaire accrue, une angiogénèse tumorale, ainsi qu'à une résistance aux traitements anticancéreux. À cet effet, les niveaux sériques de hANG ont été signalés comme étant régulés à la hausse dans plus de 20 types de cancers (Chen & Hu, 2010). Les observations suggérant l'effet de hANG dans différents types de cellules cancéreuses demeurent toutefois partielles et sont résumées dans les sections suivantes.

#### ***1.3.1 hANG dans l'angiogénèse tumorale***

Puisque les tissus du corps humain nécessitent une communication moléculaire constante, des états cellulaires pathologiques surviennent régulièrement lorsque la structure et la fonction des vaisseaux sanguins sont anormalement régulés (Tao & Qiu, 2020). La croissance excessive et la structure anormale des vaisseaux sanguins sont des signes caractéristiques exploités par les

cellules cancéreuses pour accélérer leur progression (Eelen et al., 2020). hANG joue un rôle crucial dans l'orchestration de plusieurs étapes de l'angiogenèse chez les cellules cancéreuses (He et al., 2015; Miyake et al., 2015; Tsirakis et al., 2012; Yuan et al., 2009). Nommée d'après sa fonction principale connue, hANG est un facteur puissant dans la promotion de l'angiogenèse (Badet et al., 1990). Le rôle stimulant de l'angiogenèse de hANG a été identifié pour la première fois grâce à sa capacité à promouvoir la transcription de l'ARNr suite à sa translocation nucléaire (Tsuji et al., 2005). De plus, il semble que hANG stimule la division des cellules endothéliales et qu'il est nécessaire pour l'activité du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et des facteurs de croissance fibroblastique basique (bFGF) (Kishimoto et al., 2005). Le VEGF et le bFGF sont des stimulateurs angiogéniques connus qui activent la synthèse des protéines par les voies mTOR et S6 kinase (Kishimoto et al., 2005). En général, hANG agit de manière synergique avec le VEGF et le bFGF pour promouvoir la synthèse des protéines dans les cellules en stimulant la transcription de l'ARNr dans le noyau (Kishimoto et al., 2005; Moroianu & Riordan, 1994b; Tsuji et al., 2005). Dans l'ensemble, la translocation nucléaire est considérée comme essentielle pour que hANG exerce son rôle dans la stimulation de l'angiogenèse (Sadagopan et al., 2009). En plus de sa capacité à améliorer la biosynthèse de l'ARNr après translocation dans le noyau, hANG peut également activer ERK1/2 et Akt dans les cellules endothéliales pour favoriser la traduction de nombreuses protéines ribosomiques pour la croissance cellulaire (H. M. Kim et al., 2007). hANG peut également activer l'activité de la synthase d'oxyde nitrique (NOS) pour favoriser l'accumulation d'oxyde nitrique pour la physiologie vasculaire (Trouillon et al., 2010, 2011). Plus précisément, cela mène à l'activation indirecte de la voie de signalisation PI3K/Akt par hANG, ce qui conduit à une production soutenue de NO et favorise une série de réactions cellulaires, notamment l'angiogenèse (Peng et al., 2014; J. Wu et al., 2021).

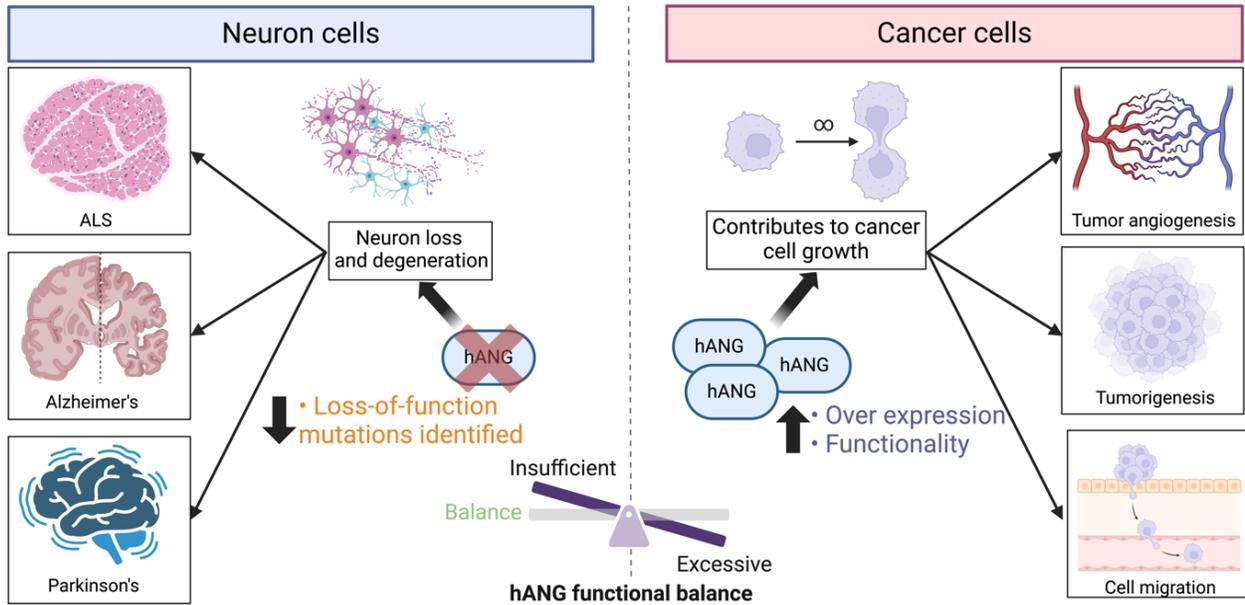
De plus, hANG favorisait l'angiogenèse en supprimant les microARN dans le microenvironnement tumoral. Les microARN miR-542-3p et miR-141 agissent comme des inhibiteurs de l'angiogenèse et de la progression tumorale par différents mécanismes (He et al., 2015; Weng, Dong, Bai, et al., 2022). miR-542-3p inhibe l'angiogenèse tumorale en ciblant l'angiopoïétine-2 (He et al., 2014, 2015) et hANG bloquerait l'expression de miR-542-3p suite à sa transcription dans le noyau (He et al., 2015), supportant le rôle de la localisation nucléaire de hANG dans ses activités angiogéniques (Mao et al., 2024). De même, miR-141 régule négativement de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse (Dong et al., 2019). Mais dans ce cas, hANG interagirait plutôt avec miR-141 dans le cytoplasme pour réduire son accumulation grâce à son activité ribonucléase (Weng, Dong, Bai, et al., 2022). En résumé, la promotion de l'angiogenèse par hANG est un

processus complexe nécessitant des recherches supplémentaires pour mieux comprendre les diverses activités de hANG au noyau et dans le cytoplasme de hANG.

### ***1.3.2 Observations suggérant le rôle de hANG dans le développement tumoral***

hANG est reconnue comme un facteur qui affecte non seulement l'angiogenèse tumorale, mais également plusieurs autres marqueurs associés à certains types de cellules cancéreuses. Les tumeurs solides sont souvent composées de régions présentant des conditions de croissance défavorables, où les cellules subissent des changements d'expression génétique pour s'adapter et survivre (Sheng & Xu, 2016). hANG joue un rôle crucial dans plusieurs étapes du développement des tumeurs, notamment en protégeant les cellules cancéreuses des conditions défavorables, en déclenchant la prolifération cellulaire, en favorisant la mobilité et l'invasion des cellules cancéreuses, et en induisant l'angiogenèse. Ainsi, hANG stimulerait indirectement la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (une voie de signalisation importante dans la croissance cellulaire, la survie cellulaire, ainsi que l'inhibition de l'apoptose) dans les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses de la vessie (Peng et al., 2014; Trouillon et al., 2010). La diminution de hANG pourrait inhiber la croissance et induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la vessie (Shu et al., 2015). En plus, hANG pourrait jouer un rôle dans le processus de tumorigenèse du cancer de la vessie par l'activation de MMP2 (Peres et al., 2016).

hANG est également connue pour sa capacité à favoriser la migration cellulaire, jouant un rôle important dans la régulation de la migration cellulaire dépendante de la plasmine dans les cellules cancéreuses du sein (Dutta et al., 2014). hANG favoriserait la survie cellulaire, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses de la prostate et serait impliquée dans l'angiogenèse tumorale et l'invasion des tissus prostatiques normaux (Marzo et al., 2022) Jones et al., 2012; S. Li et al., 2012; Vanli & Guo-Fu, 2015). hANG est également connue pour réguler la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus clé dans la progression du carcinome hépatocellulaire (Lv et al., 2019). De plus, il a été démontré que le métabolisme cytoplasmique de l'ARNt par hANG joue un rôle important dans la survie, la croissance et le développement des cellules cancéreuses gastro-intestinales (Razavi et al., 2021). De même hANG favoriserait la métastase du cancer colorectal par la production de ARNti dans le cytoplasme (S. Li et al., 2019). Enfin, hANG a même été montrée comme étant capable d'interférer dans le traitement des cellules cancéreuses. Des observations pointent vers une corrélation entre l'expression de hANG et la résistance aux radiations (Guo et al., 2021), régulant la sensibilité cellulaire au médicament anticancéreux Erlotinib (Wang et al., 2018).



**Figure 1.5 Aspects fonctionnels de hANG observés à plusieurs stades avancés de certains types de cancers et chez certaines maladies neurodégénératives.** Figure composée à partir des données des articles (Cruz & Woychik, 2016; Dutta et al., 2014; He et al., 2015; Jones et al., 2012; Y. N. Kim & Kim, 2012; S. Li et al., 2012; Marzo et al., 2022; Peres et al., 2016; Steidinger et al., 2011, 2013; Vanli & Guo-Fu, 2015; Weng, Dong, Bai, et al., 2022). Figure créée à l'aide de BioRender.com.

Bien que hANG ait fait l'objet de recherches approfondies depuis plus de 30 ans, ses fonctions physiologiques et/ou pathologiques ne sont toujours pas entièrement comprises (Weng, Dong, Bai, et al., 2022). Dans l'ensemble, il est évident que les activités cellulaires de hANG et les processus qui gèrent le développement de différents cancers sont étroitement liés, ce qui a contribué à la multiplication d'études visant à définir son rôle et ainsi évaluer le potentiel de hANG en tant que cible thérapeutique. D'une façon complémentaire, les multiples activités cellulaires de hANG ont contribué à associer cette protéine à des rôles complexes et multifactoriels dans différentes affections neurologiques (Figure 1.5).

### 1.3.3 hANG et les troubles neurodégénératifs

Ces dernières années, des études ont montré que hANG semble également impliquée dans divers troubles neurologiques à travers des mécanismes complexes. Il est important de noter que la plupart des conclusions reposent sur des variantes génétiques qui entraînent des modifications dans la localisation subcellulaire ou une perte de fonction de hANG. De fait, des études sur

l'impact de hANG et ses variants dans plusieurs affections neurologiques primaires, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ont été entreprises.

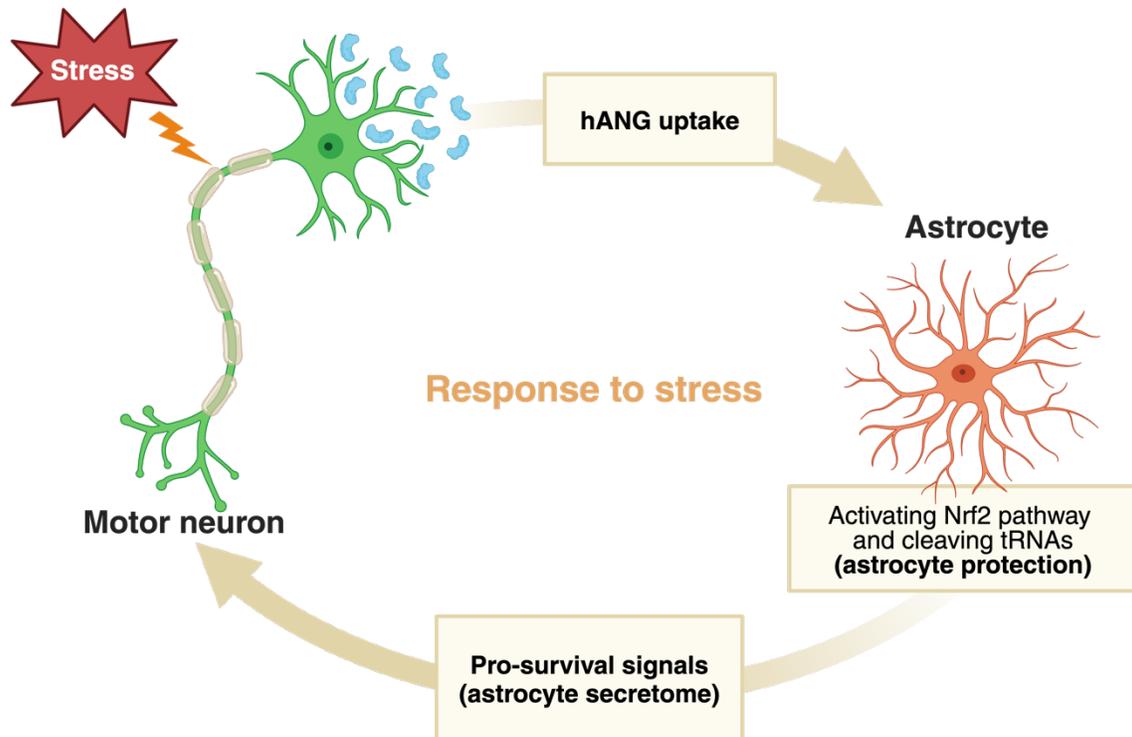
Ainsi, dans la maladie de Parkinson (MP), il a été signalé que certaines variantes de hANG présentaient des niveaux réduits d'activité ribonucléolytique par rapport à hANG sauvage (Bradshaw et al., 2017). Tout d'abord, plusieurs variantes de hANG dans la MP ont été confirmées comme réduisant ses importantes activités ribonucléotiques (Fasoli et al., 2021). De plus, des études antérieures ont révélé que les niveaux d'ANG dans le corps des patients parkinsoniens sont considérablement réduits, ce qui peut conduire à une dégénérescence axonale, à l'apoptose des neurones et accélérer la progression de la maladie de Parkinson (Steidinger et al., 2013). hANG est connue pour cliver de manière sélective les ARNt dans le cytoplasme en conditions défavorables, générant ainsi des fragments d'ARNt (Fu et al., 2009; Yamasaki et al., 2009). On a récemment suggéré que les variations des fragments d'ARNt pourraient également être liées à la maladie de Parkinson, mais l'origine de ces fragments d'ARNt, à savoir s'ils sont médiés par le clivage de hANG, reste à clarifier (Prehn & Jirström, 2020).

Par ailleurs, les résultats concernant les niveaux de hANG dans la maladie d'Alzheimer (MA) sont contradictoires. Certaines études ont montré des niveaux plus faibles de hANG dans le sang des patients atteints de MA, liés à une détérioration cognitive (Kim & Kim, 2012), tandis que d'autres ont révélé des niveaux plus élevés dans le cerveau, également associés à un déclin cognitif chez les patients atteints de MA (Qin et al., 2015). Ces résultats divergents soulignent la complexité du rôle de hANG dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les efforts d'exploration des scientifiques se poursuivent sur le rôle de hANG dans la MA. Notamment, une étude récente a démontré la présence de mutations de hANG dans des cas de MA familiale, mais le rôle clinique de ces mutations doit encore être davantage exploré (Gagliardi et al., 2019). Plus récemment, il a été rapporté que les niveaux de hANG étaient nettement augmentés dans l'hippocampe de patients atteints de MA. Cette augmentation de hANG semble être liée à une activité accrue de clivage des ARNt et à l'induction de fragments d'ARNt (tRF) dans le groupe MA. Cependant, le rôle précis joué par hANG dans la progression de la MA n'est pas encore clairement établi et nécessite des études supplémentaires (W. Wu et al., 2021). Dans l'ensemble, quelques preuves éparses de l'implication de hANG dans la maladie d'Alzheimer ont été récemment mises en évidence, mais les mécanismes exacts par lesquels hANG est liée à la MA restent à élucider et nécessitent des recherches plus approfondies sur les mécanismes sous-jacents.

À la lumière de ces observations, il semble clair que hANG joue des rôles complexes et multifactoriels et pourrait agir comme un facteur neuroprotecteur ou un médiateur pathogène,

selon le contexte de la maladie et sa concentration. De fait, des études ont montré que hANG, un facteur de croissance sécrété par les neurones, possède plusieurs mécanismes neuroprotecteurs et joue un rôle crucial dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire. Ainsi, des mutations de perte de fonction dans hANG ont été liées à la sclérose latérale amyotrophique (SLA), une maladie des motoneurones associée à plus de 20 mutations génétiques dans hANG (Prehn & Jirström, 2020). Cela suggère l'implication directe de hANG dans les voies conduisant à la dégénérescence des motoneurones (Crivello et al., 2018; Kieran et al., 2008). La recherche a démontré que hANG protège les motoneurones primaires de souris en culture en favorisant la signalisation de survie cellulaire via les kinases PI3-kinase/Akt (Kieran et al., 2008). De plus, l'administration systémique de hANG recombinante a augmenté la durée de vie et la fonction motrice chez les souris SOD1G93A, un modèle de la SLA.

hANG contribue également à la survie des motoneurones en cas d'hypoxie (Subramanian et al., 2008), de lésions excitotoxiques, de stress du réticulum endoplasmique et de privation de facteurs trophiques (Kieran et al., 2008)(Subramanian et al., 2008). Or, les variants inactifs de hANG abolissent ces effets, démontrant que l'activité ribonucléolytique de hANG permet la survie des motoneurones (Kieran et al., 2008; Subramanian et al., 2008). Pour la protection neuronale contre le stress oxydatif, hANG déclencherait des programmes de réponse au stress en clivant les ARNt en ARNti (Mayer & Grummt, 2006). En tant que facteur sécrété, hANG possède des effets neuroprotecteurs grâce à son endocytose par les astrocytes et à la signalisation paracrine (Skorupa et al., 2012; Trendelenburg & Dirnagl, 2005). Le mécanisme de base (Figure 1.6) est que les cellules nerveuses stressées sécrètent hANG, qui se lie ensuite à son récepteur syndécan-4 pour être capté par les astrocytes. À l'intérieur des astrocytes, hANG peut activer la voie Nrf2 pour protéger les neurones et se défendre contre la toxicité induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ferguson & Subramanian, 2018). De plus, hANG peut cliver les ARNt pour produire des ARNti, qui jouent un rôle important dans la reprogrammation de la synthèse des protéines (Skorupa et al., 2012). En conséquence, les profils de traduction des protéines sont modifiés et les motoneurones reçoivent des signaux de survie via la voie PI3K/Akt (Aparicio-Erriu & Prehn, 2012; Prehn & Jirström, 2020).



**Figure 1.6** Activité neuroprotectrice de hANG dans les astrocytes et les neurones moteurs (Figure composée à partir des données publiées dans (Aparicio-Erriu & Prehn, 2012; Hoang et al., 2019; Skorupa et al., 2013). Figure créée à l'aide de BioRender.com.

## 1.4 Localisation cellulaire et fonction biologique de hANG

### 1.4.1 La translocation nucléaire de hANG

Il a déjà été mentionné que la translocation nucléaire de hANG joue un rôle important à la fois dans ses effets angiogéniques et le potentiel angiogénique d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) (Sadagopan et al., 2009). De plus, la localisation de hANG et son activité ribonucléase sont régulées par l'inhibiteur de la ribonucléase (RI) (Pizzo et al., 2013). Une fois à l'intérieur du noyau, hANG stimule la transcription de l'ARN ribosomique (ARNr) (Z. ping Xu et al., 2002), ce qui entraînerait la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Kishimoto et al., 2005). Des études mécanistiques ont révélé que hANG se combine avec le gène de l'ARN ribosomique (ADNr) (Hu et al., 2000) et l'élément de contrôle en amont du coactivateur de l'ADNr pour stimuler la transcription de l'ARNr (Sheng et al., 2014). En plus de la transcription, hANG participe également à la préparation de l'ARNr fonctionnel (Monti et al., 2009), un

processus qui comprend la synthèse des ribosomes, la transcription de l'ARNr et sa maturation, et l'assemblage avec les protéines ribosomiques, ce qui détermine finalement le taux de traduction des protéines (Gourse et al., 1996; Kressler et al., 2010). La traduction stimulée de l'ARNr dans les cellules endothéliales est cruciale pour leur prolifération et leur angiogenèse (Ibaragi, Yoshioka, Kishikawa, et al., 2009; Sadagopan et al., 2009). De plus, d'autres facteurs pro-angiogéniques dépendent de hANG pour stimuler cette traduction de l'ARNr dans les cellules vasculaires. L'inhibition de hANG réduit la croissance des vaisseaux sanguins induite non seulement par hANG, mais également par d'autres facteurs tels que le VEGF (Kishimoto et al., 2005). Par conséquent, la traduction régulée de l'ARNr stimulé par hANG dans le noyau agit comme un point de convergence pour la néovascularisation stimulée par de multiples stimuli.

#### ***1.4.2 Compréhension récente de l'effet de la néomycine sur la localisation cellulaire de hANG***

La néomycine est un antibiotique aminoglycoside qui contient deux ou plusieurs sucres aminés reliés par des liaisons glycosidiques (Figure 1.7). Lors des premières études sur le mécanisme de translocation nucléaire de hANG, il a été constaté que la néomycine bloquait ce processus dans les cellules endothéliales, inhibant ainsi la prolifération et l'angiogenèse induites par hANG (Hu, 1998; Trouillon et al., 2022). Dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et les cellules de glioblastome U87MG, la néomycine a empêché l'entrée nucléaire de hANG et a aboli ses effets prolifératifs (Hu, 1998; Xia et al., 2015). Une étude récente a également lié la capacité de la néomycine à inhiber le transport nucléaire de hANG et de VEGF à une diminution de la phosphorylation de l'Akt et de la signalisation de l'oxyde nitrique (Trouillon et al., 2022). Dans cette étude, nous avons analysé le mécanisme d'interaction moléculaire de la néomycine avec hANG et utilisé cet antibiotique comme outil pour réguler à la baisse la translocation nucléaire de hANG afin d'identifier les fonctions associées aux états perturbés et normaux de la translocation nucléaire de hANG.

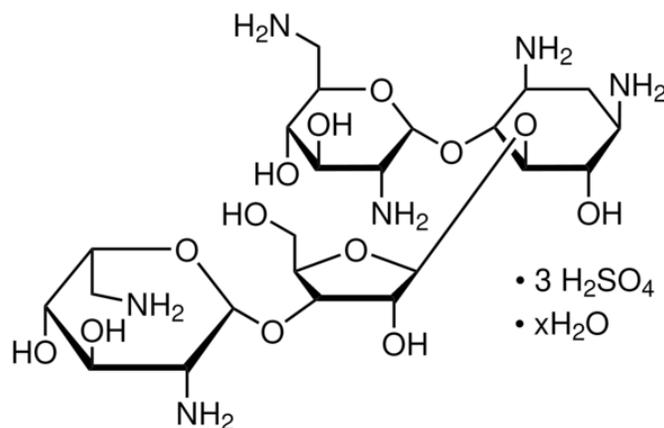


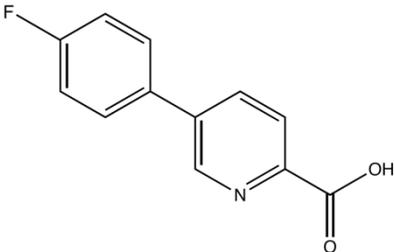
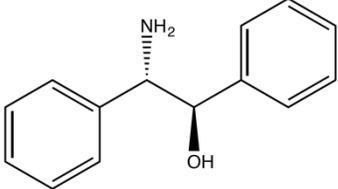
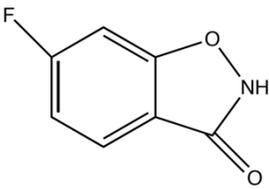
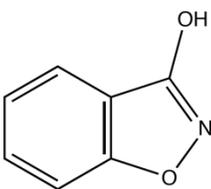
Figure 1.7 Structure chimique de la néomycine (Sigma Aldrich)

### 1.4.3 Une nouvelle molécule améliore la translocation nucléaire de hANG

Une librairie de 1640 composés de faible poids moléculaire, préparée sous forme de 169 groupes, a précédemment été utilisée dans notre laboratoire pour cribler d'éventuels ligands de hANG. Cette librairie a été conçue pour un criblage par RMN à faible débit et a été aimablement fournie par NMX Research and Solutions Inc. (Ayotte et al., 2018). À partir de ce processus de criblage, des candidats potentiels en tant que liants de hANG ont été identifiés et sont présentés dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2 Fragments obtenus après le criblage de la découverte de médicaments basée sur les fragments de hANG (Pinoteau, 2019)

Structure chimique	Nom	Masse moléculaire	Abréviation
	5-(2-Fluorophenyl)-picolinic acid	217.2	5P

	5-(4-Fluorophenyl)-picolinic acid	217.2	5F
	(1R,2S)-n-benzyl-2-amino-1,2-diphenylethanol	303.4	1R, 2S
	6-Fluorobenzo[d]isothiazol-3(2H)-one	169.2	6F
	3-Hydroxy-1,2-benzisoxazole	135.1	3H

Dans un travail antérieur de notre groupe, Marie Aude Pinoteau a rapporté l'identification d'un fragment chimique (le phenylpyridine-2-carboxylic acid, ou 5P), qui n'engendre pas une toxicité cellulaire, mais un effet négatif sur la prolifération suite à un traitement avec hANG dans deux lignées cellulaires distinctes (HeLa et SHSY-5Y, une lignée cellulaire neuronale). Ces résultats préliminaires se limitaient à l'évaluation de la viabilité cellulaire à l'aide du test Cell-Titer Blue, un indicateur de l'activité des mitochondries. Lors d'un criblage ultérieur, notre groupe a observé un analogue du composé 5P, soit le 5F (5-(4-Fluorophenyl)-picolinic acid), présentant également une affinité de liaison avec hANG. À partir de ces observations, nous avons entrepris des études supplémentaires pour caractériser leur affinité de liaison avec hANG et réaliser des analyses structurales pour comprendre l'impact moléculaire sur hANG et dans les fonctions cellulaires induites par hANG.

## 1.5 Projet de recherche

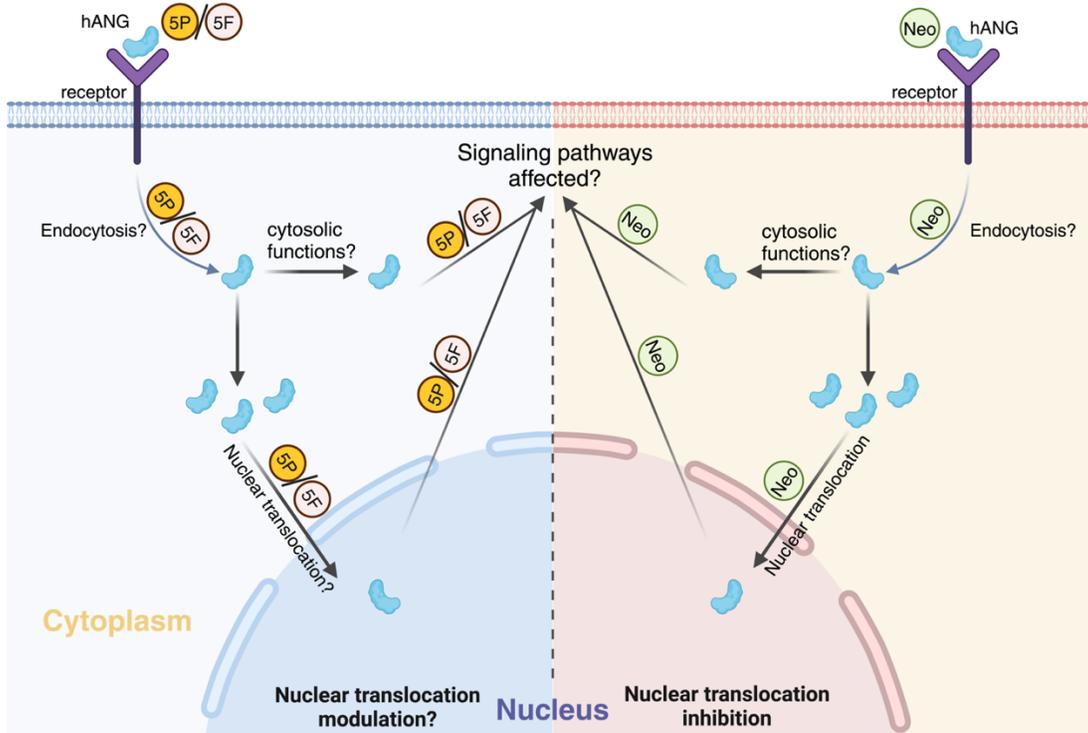
### 1.5.1 Énoncé du problème

hANG est un facteur de croissance multifonctionnel qui joue un rôle vital dans le développement des vaisseaux sanguins et dans divers processus biologiques complexes associés à des traits pathologiques en oncologie et dans les troubles neurologiques. En tant que facteur de croissance, hANG régule la prolifération cellulaire et la synthèse des protéines grâce à sa capacité à stimuler la transcription de l'ARN ribosomique (ARNr) dans le noyau (Sheng et al., 2014). Cette fonction nucléaire de hANG favorise la synthèse des protéines et la croissance cellulaire. En plus de stimuler la transcription de l'ARNr, hANG réalise également d'importantes activités cytoplasmiques telles que le clivage de l'ARN de transfert (ARNt) en conditions de stress ou de maladies (Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011), et l'activation de l'expression des gènes. On sait également que hANG réduit la mort cellulaire programmée ou l'apoptose grâce à des interactions avec des protéines supprimeuses de tumeurs comme p53 (Sadagopan et al., 2012).

Des recherches récentes ont montré que l'expression fonctionnelle de hANG dépend grandement de sa capacité à se transloquer dans le noyau cellulaire et à se relocaliser dans différents compartiments intracellulaires en fonction des conditions cellulaires changeantes (S. Li & Hu, 2012; Lyons et al., 2017; Pizzo et al., 2013; Prehn & Jirström, 2020). Des études suggèrent également que la relocalisation de hANG est associée à plusieurs pathologies neurologiques (Thiyagarajan et al., 2012; Van Es et al., 2011; D. Wu et al., 2007). Cela soulève la question de l'importance des changements de localisation de hANG dans la régulation de son activité. Dans ce contexte, de nouveaux fragments chimiques que nous avons précédemment découverts et interagissant avec hANG pourraient aider à moduler la localisation cellulaire de hANG et ses fonctions associées.

De plus, l'antibiotique aminoglycoside néomycine est connu pour agir comme un puissant bloqueur de la translocation nucléaire de hANG, mais son mode d'interaction avec la protéine n'est pas entièrement compris. À ce jour, l'influence de la relocalisation intracellulaire de hANG sur ses diverses activités moléculaires reste énigmatique. Ainsi, nous proposons d'étudier par diverses méthodes biophysiques l'interaction de la néomycine avec hANG et les effets de la modulation de la localisation de hANG sur sa fonction biologique. Dans ce contexte, les nouveaux fragments chimiques précédemment identifiés, qui semblent perturber les effets cellulaires de hANG, pourraient moduler le transit cellulaire de la protéine, tout comme la néomycine. Ainsi, ces composés, 5P, 5F et néomycine, pourraient servir d'outils pour clarifier l'influence de la

localisation intracellulaire de hANG sur ces diverses activités moléculaires. Nous émettons l'hypothèse que la modulation de la localisation de hANG aurait un impact différentiel sur les processus clés médiés par cette enzyme.



**Figure 1.8 Effets proposés des modulateurs de petites molécules sur la translocation nucléaire de hANG.** Figure créée à l'aide de BioRender.com.

Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'évaluer l'impact de la modulation de la localisation subcellulaire de hANG dans les cellules HeLa en utilisant les composés 5P, 5F et Neo (Figure 1.9). En tant que lignée cellulaire dérivée du cancer du col de l'utérus, les cellules HeLa ont été largement utilisées dans la littérature scientifique pour étudier la translocation nucléaire de hANG, ainsi que ses fonctions liées à la localisation subcellulaire (Hoang & Raines, 2017; Pizzo et al., 2013; Tsuji et al., 2005; Y. N. Wang et al., 2018). Parallèlement, dans une étude antérieure réalisée par notre groupe, les cellules HeLa ont également été employées pour évaluer l'effet sur la prolifération cellulaire de certains composés chimiques (Pinoteau, 2019). Bien que ces observations ne généralisent pas nécessairement les effets observés chez d'autres types de cellules cancéreuses, elles démontrent néanmoins la pertinence de l'utilisation de ce modèle cellulaire pour les objectifs du présent projet.

hANG joue un rôle étendu, participant à la promotion de la croissance et de la prolifération cellulaires, ainsi qu'à la survie des cellules en situation de stress. En effet, ces effets dépendent grandement de sa localisation subcellulaire (Lyons et al., 2017; Weng, Dong, Mao, et al., 2022; Yu et al., 2017). Le plan expérimental de la présente étude consiste à moduler la localisation subcellulaire de hANG dans les cellules HeLa, en utilisant les modulateurs potentiels (5P, 5F et Neo). Nous procéderons à l'analyse des cellules afin d'identifier les changements d'expression du pré-ARNr 47S, d'évaluer les niveaux de clivage de PARP-1 (un indicateur de l'apoptose cellulaire) grâce à un test d'apoptose induite par la doxorubicine, qui présuppose une mort cellulaire médiée par p53. Nous mesurerons également les niveaux d'ARN dérivés de l'ARN de transfert (ARNti) dans des conditions de localisation subcellulaire modulée de l'hANG. Les résultats de ce projet de recherche contribueront à une meilleure compréhension des relations fonctionnelles entre hANG et sa localisation intracellulaire. En révélant comment la distribution subcellulaire de hANG influe sur ses diverses activités, ces données pourront fournir un aperçu initial du rôle précis de cette protéine dans les processus physiologiques et pathologiques.

### **1.5.2 Hypothèse et objectifs de recherche**

**Hypothèse :** La modulation de la localisation subcellulaire de hANG aurait un impact différentiel sur les processus clés médiés par hANG.

**Objectifs :**

- Objectif 1 : Exprimer et purifier hANG recombinante.
- Objectif 2 : Confirmer et caractériser les sites de liaison des composés de petites molécules à la surface de hANG.
- Objectif 3 : Évaluer l'effet de la modulation de la localisation subcellulaire de hANG par les fragments moléculaires sur ses diverses activités biologiques dans les cellules HeLa.

## 2 MÉTHODOLOGIE

---

### 2.1 Matériaux

#### 2.1.1 Souches bactériennes

Les souches d'*Escherichia coli* BL21(DE3) avec le génotype suivant ont été obtenues du laboratoire d'Eric Déziel à l'INRS : F (-) ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) I(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) BCCM/GeneCorner (Cat#LMBP1455). Les souches d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  avec le génotype suivant ont également été obtenues du laboratoire Déziel : supE44 DlacU169 (480 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Cat#DSM6897).

#### 2.1.2 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire HeLa, un adénocarcinome du col de l'utérus humain, a été acquise auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle a été cultivée dans un milieu EMEM (Wisent) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Wisent), comme recommandé par le fournisseur. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque la confluence atteignait 80%, un ratio de subculture de 1:4 était utilisé pour inoculer de nouveaux flacons de culture.

### 2.2 Expression et purification de l'angiogénine humaine recombinante (hANG)

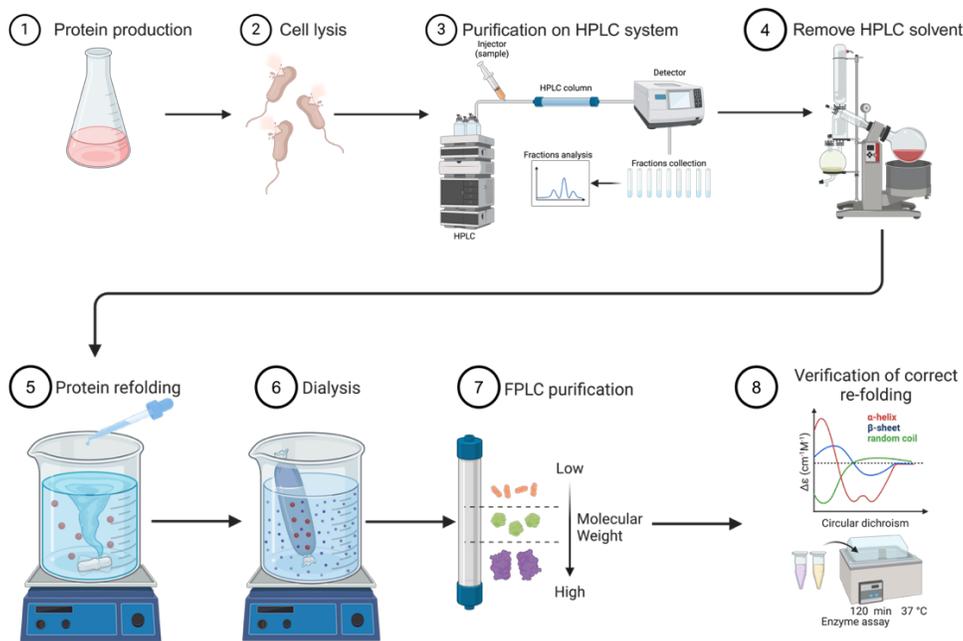
#### 2.2.1 Expression de l'angiogénine humaine recombinante (hANG)

L'expression de hANG a été réalisée en suivant le protocole décrit par (Tran et al., 2024), avec les modifications suivantes mises en œuvre. La séquence de hANG a été optimisée pour l'utilisation des codons d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et insérée dans le vecteur d'expression pJexpress414 après digestion avec les enzymes *Nde*I et *Hind*III. Le plasmide recombinant a ensuite été transféré dans les cellules d'*E. coli* BL21(DE3) par choc thermique pour l'expression de la protéine. Les cellules transformées ont été sélectionnées puis cultivées dans 500 mL de milieu de culture Luria-Bertani (LB) à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,6-0,8. L'expression de la protéine a ensuite été induite en ajoutant 1 mM d'isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et l'incubation s'est poursuivie pendant 4-5 heures. En fin de

production, les cellules ont été collectées par centrifugation, puis lysées afin de récupérer hANG sous forme de corps d'inclusion après une dernière centrifugation.

### 2.2.2 Replie ment *in vitro* et purification de l'angiogénine humaine recombinante

Pour éviter l'agrégation de la protéine, la procédure de replie ment a été initiée par une dilution goutte à goutte de 1:10 de la protéine dénaturée dans 400 mL de tampon RB (tampon Tris-acétate 100 mM à pH 8,5 contenant 0,5 M de L-arginine, 3,2 mM de glutathion oxydé (GSSG) et 1,6 mM de glutathion réduit (GSH) à 4°C), et a été complétée après incubation en agitant à la vitesse la plus basse pendant 48 à 72 heures (à 4°C).



**Figure 2.1 Protocole d'expression et de purification de l'angiogénine humaine utilisé dans la présente étude.**  
Figure créée à l'aide de BioRender.com.

La protéine a ensuite été repliée dans une solution contenant du GSH:GSSG (rapport final de 1:2) en utilisant la méthode de goutte-à-goutte pendant 48 à 72 heures. Ensuite, la protéine dans la solution de replie ment a été dialysée contre le tampon A (acétate de sodium 15 mM, pH 5,0) pour éliminer le sel avant la purification sur une colonne de chromatographie d'échange d'ions. La protéine a été purifiée sur une colonne HiTrap SP HP 5 ml (Cytiva) en utilisant un tampon d'élu tion (acétate de sodium 15 mM, NaCl 2M, pH 5,0 ; tampon B). Le processus de purification a impliqué un mode de gradient de 0% à 50% de tampon B en 40 minutes sur le système de FPLC ÄKTA Purifier 100 (GE HealthCare). Les solutions de protéines ont ensuite été concentrées à l'aide de

filtres Amicon Ultra 3 kDa de 15 ml (EMD Millipore) à 3 800g (4 ° C). Enfin, l'angiogénine humaine recombinante (hANG) a été vérifiée pour son repliement correct en utilisant le dichroïsme circulaire (CD) et pour sa capacité à cliver un substrat d'ARN de levure (Figure 2.1).

### **2.2.3 Évaluation du repliement correct de la protéine et de son activité catalytique**

#### **2.2.3.1 Dichroïsme circulaire (DC)**

Un spectropolarimètre Jasco J-815 équipé d'un système thermostatique Peltier Jasco CDF-426S/15 a été utilisé pour analyser la structure secondaire de hANG repliée par dichroïsme circulaire (DC). Toutes les expériences de balayage thermique ont été réalisées avec 20 µM de protéine libre dans 200 µL de tampon A (acétate de sodium 15 mM, pH 5,0). Les spectres ont été enregistrés à 20 °C de 200 nm à 250 nm dans une cuvette en quartz de 1 mm d'épaisseur. La vérification ultérieure du repliement de la protéine a été confirmée par spectroscopie RMN (voir les sections ci-dessous).

#### **2.2.3.2 Test ribonucléolytique**

L'ARNt de levure (Sigma, Mississauga, CAN) à une concentration de 2 mg/ml a été incubé dans un tampon de réaction (33 mM HEPES, 33 mM NaCl, pH 7,5) pendant 2 heures en présence d'hANG (300 nM), avec ou sans inhibiteur de la ribonucléase (Thermo scientific, 300 µM) ou de petites molécules (5P, 5F à 300 µM). La réaction enzymatique a été arrêtée en plaçant les échantillons dans de l'azote liquide et les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à ce que l'analyse SDS-PAGE soit effectuée. Pour évaluer le clivage de l'ARNt, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'urée/acrylamide à 10% et colorés avec du GelRed (Sigma Aldrich). L'intensité des bandes de taille inférieure, évaluée avec le logiciel ImageJ, a été utilisée pour quantifier l'étendue du clivage de l'ARNt, normalisée pour chaque expérience avec les résultats obtenus pour le traitement avec hANG seule. Les résultats représentent la quantification réalisée sur 3 tests ribonucléolytiques différents réalisés en double.

## **2.3 Test d'affinité de liaison**

### **2.3.1 Titrages par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Tout d'abord, hANG recombinante a été exprimée dans un milieu MJ avec <sup>15</sup>N comme seule source d'azote (pour marquer les échantillons de protéine avec <sup>15</sup>N). Le protocole d'expression et

de purification était similaire à la description de la section 2.2, avec les modifications mises en œuvre dans le milieu (MJ medium, Annexe Section 6.2, Milieu).

<sup>15</sup>N-hANG a été préparée dans un tampon d'acétate de sodium à 15 mM (pH 5,0) ; ou dans un tampon de phosphate de potassium à 20 mM à pH 6,5. La quantité de protéine a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000c en utilisant un coefficient d'extinction théorique de 11 835 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (calculé à l'aide de Protparam, <https://web.expasy.org/>). Toutes les expériences ont été réalisées à 298 K sur des échantillons contenant de 50 à 200 μM d'enzyme dans un tampon d'acétate de sodium à 15 mM (pH 5,0) ; ou dans un tampon de phosphate de potassium à 20 mM à pH 6,5, avec 10% de D<sub>2</sub>O. Les composés ont été préparés séparément, avec 5P et 5F dissous dans du DMSO-d<sub>6</sub> (concentration initiale de 400 μM) et Neo dissous dans de l'eau (concentration initiale de 50 mg/mL, selon les recommandations du fournisseur, Sigma Aldrich). Ces composés ont ensuite été dilués davantage dans les tampons RMN avant utilisation. Les expériences de RMN ont été réalisées sur un spectromètre RMN Bruker à 800 MHz (QANUC, Université McGill) équipé d'une crysonde à triple résonance avec capacité de gradients de champ d'impulsion. Le logiciel NMRbox a été utilisé pour traiter tous les spectres. NMRbox est une ressource pour la RMN biomoléculaire et comprend des outils logiciels essentiels tels que NMRPipe et CcpNmr Analysis pour une analyse efficace des données de RMN (<https://nmrbox.nmrhub.org/>). Des spectres bidimensionnels <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC de hANG ont été enregistrés pour confirmer les attributions des résonances du squelette peptidique. Les attributions des protéines ont été obtenues à partir des entrées 26748 ou 50650 de la Banque de données de résonance magnétique biologique (BMRB), en fonction de leurs valeurs respectives de tampon et de pH. Des expériences de titrage par RMN ont été réalisées en utilisant 5P, 5F ou la néomycine dissoute dans le tampon de RMN. Des spectres <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC ont été enregistrés en présence de 0, 1, 5, 10, 20, 40 ou 60 équivalents molaires de 5P, 5F ou Neo. Les valeurs de déplacements chimiques composés Δδ (<sup>1</sup>H et <sup>15</sup>N) ont été calculées à l'aide de l'équation suivante:

$$\Delta\delta = [(\Delta\delta_H^2 + \Delta\delta_N^2/25)/2]^{1/2} \text{ (ppm)} \text{ (Grzesiek et al., 1996)}$$

### **2.3.2 Thermophorèse à micro-échelle (MST)**

L'affinité entre l'angiogénine et le ligand a été mesurée par MST en utilisant le colorant RED-NHS de deuxième génération et le kit de marquage RED-NHS (Nanotemper Technologies, Allemagne), conformément au protocole du fabricant. La sonde non liée à la protéine a été éliminée à l'aide des colonnes de purification fournies. Les essais d'affinité de liaison entre cette protéine marquée

et les composés ont été réalisés dans un tampon de tartrate de potassium sodium à 50 mM, HEPES à 100 mM, NaCl à 100 mM, pH 7,0, complété avec 0,05% (v/v) de Tween 20. Une série de 16 dilutions en série d'un facteur 2 (protéine : ligand) a été préparée pour déterminer les valeurs de  $K_D$ , en utilisant des protéines marquées à une concentration finale de 5 nM (à partir d'un stock de 10  $\mu$ M) et des ligands à des concentrations allant de 3  $\mu$ M à 25 mM pour la néomycine et les composés (5P, 5F). Les échantillons ont ensuite été chargés dans des capillaires standard Monolith NT.115 et la thermophorèse à microéchelle a été réalisée à l'aide d'un instrument Monolith NT.115 Pico (Nanotemper Technologies, Allemagne) à température ambiante. Les données de 3 expériences obtenues de manière indépendante ont été analysées avec le logiciel MO. Affinity, version 2.3 (Nanotemper Technologies, Allemagne), en utilisant un temps MST-on entre 5 s et 10 s pour déterminer les valeurs de  $K_D$ .

### ***2.3.3 Titrage calorimétrique isotherme (ITC)***

Toutes les expériences d'ITC ont été réalisées en triplicata à 25°C en utilisant un microcalorimètre Nano ITC (TA Instruments). Tout d'abord, 300  $\mu$ L d'hANG à 100  $\mu$ M ont été préparés dans un tampon MES à 20 mM (pH 6,5) et injectés dans la cellule Nano ITC. 10 mM de composés ont été dissous dans le même tampon et remplis dans la seringue. Le titrage a été réalisé avec 24 injections de 2  $\mu$ L de composés dans la protéine, à une vitesse d'agitation de 150 rpm et un intervalle de 150 s entre chaque injection. Un contrôle négatif a été réalisé en titrant chaque ligand dans un tampon sans protéine. Les données ont été analysées et ajustées à l'aide du logiciel NanoAnalyze v.2.3.6 (TA Instruments).

## 2.4 Essais biologiques

### 2.4.1 Viabilité/prolifération cellulaire

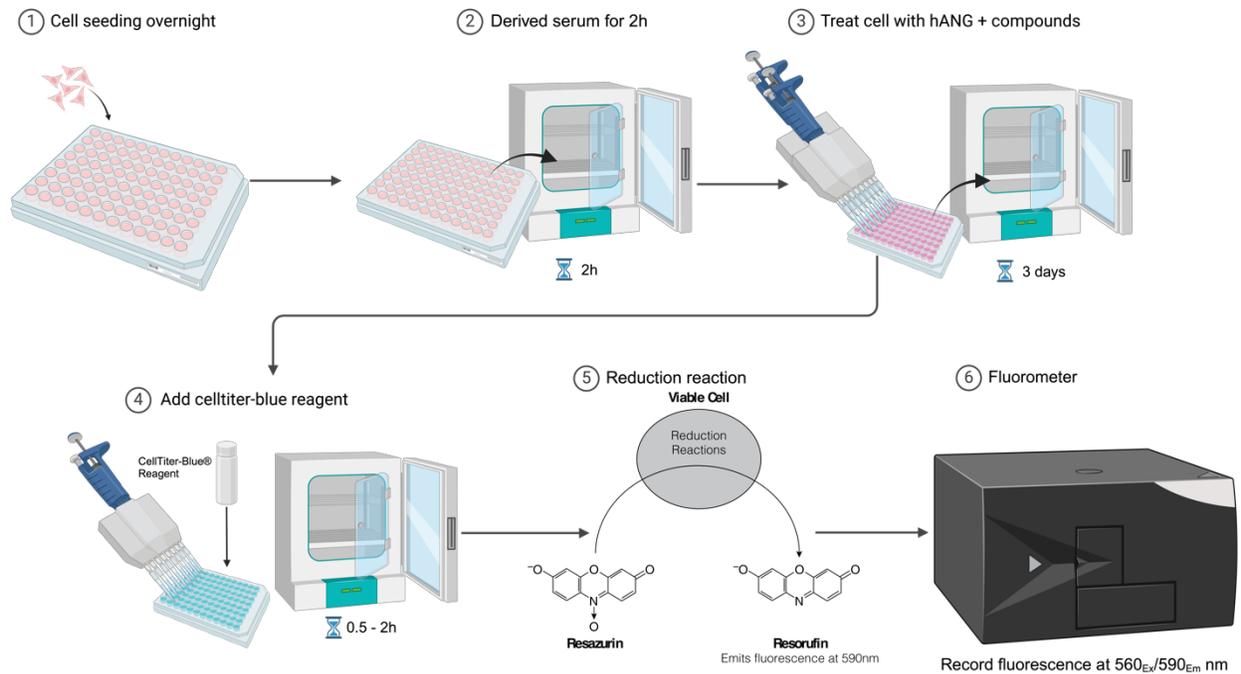


Figure 2.2 Essai de prolifération cellulaire réalisé dans la présente étude. Figure créée à l'aide de BioRender.com.

L'essai de prolifération cellulaire a été effectué selon les étapes décrites dans la Figure 2.2, avec les détails suivants. Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10 000 cellules HeLa/puits) dans un milieu de culture complet et incubées à 37°C pendant la nuit. Le milieu de culture complet a ensuite été remplacé par un milieu sans sérum, et le traitement avec l'angiogénine, les ligands, ou les deux ont été initié 2 heures plus tard. Les cellules ont été incubées pendant 5 jours à 37°C avant d'ajouter 20 µL de solution stock du réactif CellTiter Blue (Promega, Madison, WI, USA) à chaque puits pour évaluer la capacité des cellules à réduire la résazurine en résorufine. La production de résorufine a été mesurée par émission de fluorescence à 590 nm après excitation à 560 nm, selon les recommandations du fabricant. Les résultats représentent au moins 3 expériences indépendantes réalisées avec 8 répliques pour chaque condition.

### **2.4.2 Essais de translocation nucléaire**

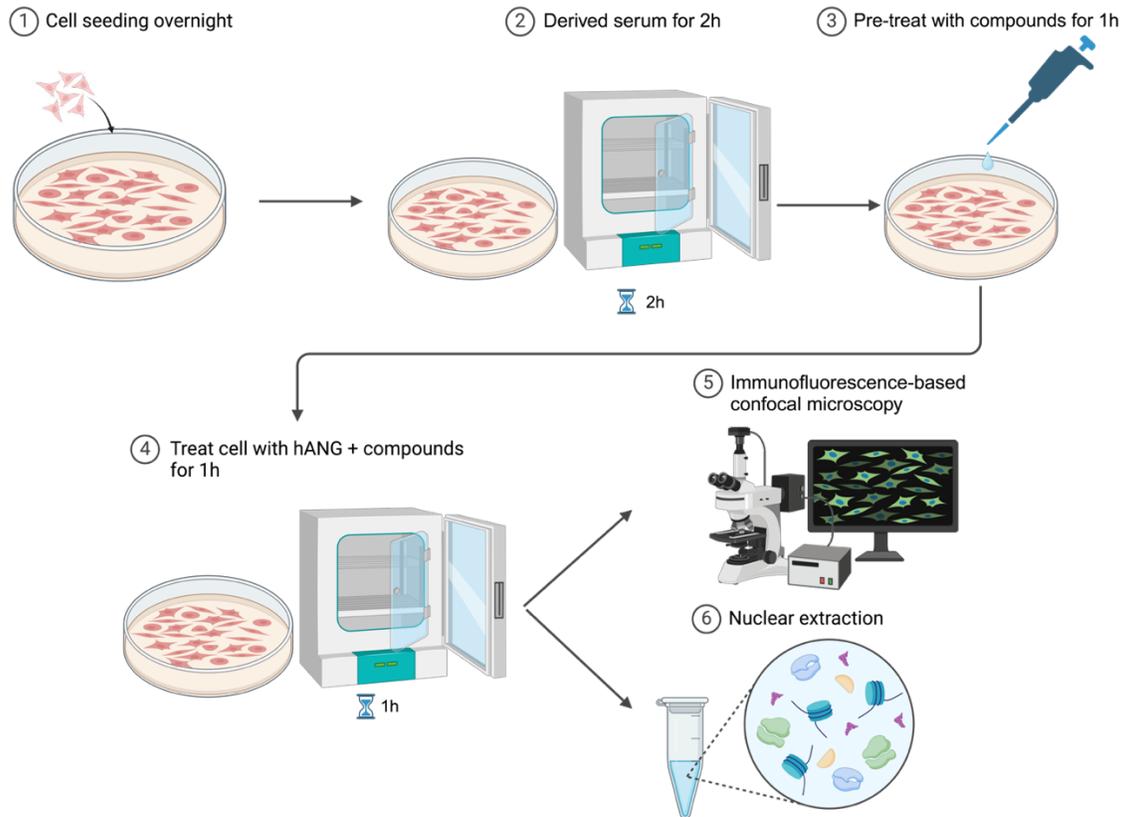
Des essais de translocation nucléaire ont été réalisés pour détecter l'internalisation et la translocation de hANG dans le noyau cellulaire pendant une durée d'une heure. Dans cette étude, nous avons utilisé deux méthodes pour analyser la translocation nucléaire de hANG : la microscopie confocale basée sur l'immunofluorescence et les essais d'extraction nucléaire CellLytic™ utilisant des kits de Sigma-Aldrich (Figure 2.3).

#### *2.4.2.1 Microscopie confocale basée sur l'immunofluorescence*

Des cellules HeLa ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits dans une plaque 24 puits contenant des lamelles de microscope, incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> afin de favoriser l'adhérence cellulaire. Lorsque la confluence a atteint environ 80%, les cellules ont été privées de sérum pendant 2 heures, puis prétraitées avec les composés (5P, 5F ou Neo) dans un milieu EMEM sans sérum pendant 1 heure. Elles ont ensuite été traitées avec 100 nM de hANG pendant 1 heure dans un milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) avant d'être fixées avec une solution froide de méthanol : acide acétique (rapport de 3:1) pendant 15 minutes sur glace. Les cellules ont été perméabilisées à l'éthanol 70% et bloquées avec une solution de BSA 5% dans du PBS. Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-hANG (clone 26-2F) pendant la nuit à 4°C, puis avec un anticorps secondaire F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-souris IgG (H+L) adsorbé croisé, conjugué à l'Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific) pendant 1 heure à température ambiante. La présence de hANG est associée à l'intensité de la fluorescence verte de l'Alexa Fluor™ 488, alors que les noyaux cellulaires ont été observés par une coloration bleue au 4', 6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; Life Technologies).

Après trois derniers lavages rapides avec du PBS, les cellules fixées ont été montées sur des lames de verre de microscope de 1 mm (Fisher Scientific, ON, Canada) en utilisant le réactif antifade ProLong™ Gold (Invitrogen). Les cellules ont été examinées et les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal LSM780 (Carl Zeiss Microimaging) à la Plateforme de Microscopie Confocale du Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie de l'INRS. Les images des cellules colorées ont été acquises à partir d'au moins cinq champs, chacun contenant un minimum de 6 à 8 cellules. Barre d'échelle (gris-blanc) = 10 µm. Enfin, les images ont été traitées avec le logiciel Fiji version 2.3.0. Les résultats représentent au moins trois expériences indépendantes.

### 2.4.2.2 Essai d'extraction nucléaire CellLytic™



**Figure 2.3 Essais de translocation nucléaire de hANG réalisés dans la présente étude.** Figure créée à l'aide de BioRender.com.

Les cellules HeLa ont étéensemencées à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/boîte de Petri de 100 mm, incubées à  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Lorsque la confluence a atteint environ 80%, les cellules ont été privées de sérum pendant 2 heures, puis prétraitées avec les composés dans un milieu EMEM sans sérum pendant 1 heure. Elles ont ensuite été traitées avec 100 nM de hANG pendant 1 heure dans un milieu sans sérum. Après le traitement, les cellules ont été récoltées, lavées au PBS, puis centrifugées. Les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites à l'aide du kit d'extraction nucléaire CellLytic™ (Sigma-Aldrich) selon les instructions™ du fabricant. La translocation subcellulaire de hANG a été analysée par la quantification de l'intensité de hANG dans les fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques, respectivement, à l'aide d'un immunobuvardage de type Western (détails dans la section 2.4.4). Les résultats représentent un triplicata d'expériences indépendantes.

### **2.4.3 Essai d'apoptose cellulaire avec la doxorubicine (essai PARP-1)**

Les essais d'apoptose ont été mesurés en utilisant les niveaux de clivage de la PARP-1 de 24 kDa dans les cellules HeLa détectés par immunobuvardage de type Western. Les cellules HeLa ont étéensemencées pendant la nuit dans une plaque à 6 puits (SARSTEDT) à une densité de 750 000 cellules/puits pour favoriser l'adhérence. Le jour suivant, les cellules ont d'abord été placées dans un milieu EMEM sans sérum pendant 2 heures, puis traitées avec 100  $\mu$ M de composés (5P, Neo) pendant 1 heure, puis incubées avec 100 nM hANG pendant 1 heure pour l'internalisation, de manière séquentielle. Le traitement à la doxorubicine a été effectué à une concentration de 7,5  $\mu$ M pendant 4 heures pour induire l'apoptose. Les cellules après traitement ont été récoltées et des extraits de cellules entières ont été utilisés pour analyser le niveau de clivage de PARP-1 de 24 kDa par analyse par immunobuvardage de type Western (détails dans la section 2.4.4). Les résultats représentent un duplicata d'expériences indépendantes.

### **2.4.4 Immunobuvardage de type Western**

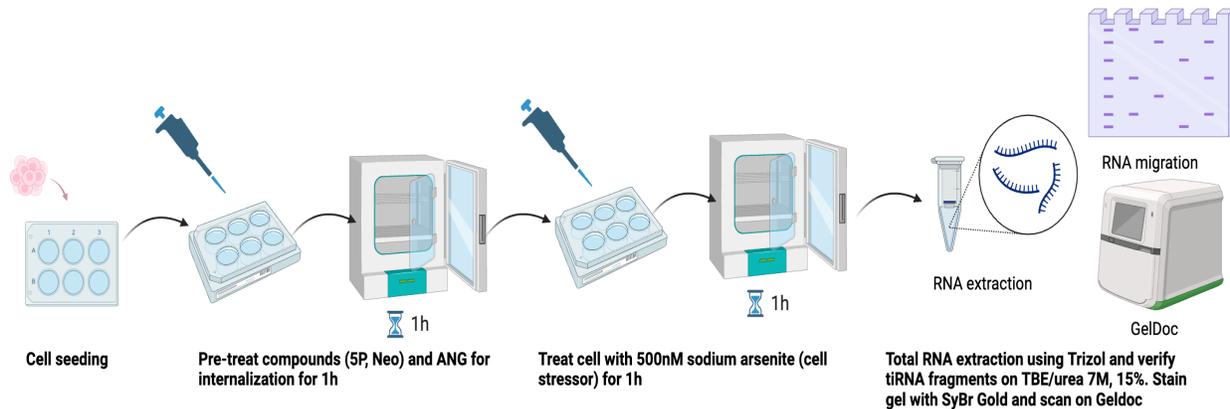
Pour les essais de translocation nucléaire, les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites à l'aide de kits commerciaux (Sigma-Aldrich) en suivant les instructions du fabricant. Pour les tests d'apoptose, les extraits de cellules entières ont été homogénéisés et resuspendus dans un tampon RIPA contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, 1% (v/v) cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) suivant les instructions du fabricant. Les échantillons de protéines ont été quantifiés par un kit de dosage de protéines BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific). Des quantités égales d'extraits de cellules entières (25-50  $\mu$ g) ont été séparées sur un gel gradient SDS-PAGE 4-20% (Bio-Rad Laboratories) et transférées sur des membranes de polyvinylidène fluorure (PVDF) (Bio-Rad Laboratories). Après le transfert, les membranes de PVDF ont d'abord été bloquées dans une solution de lait écrémé à 5% dans une solution TBS/0,05% Tween 20 pendant 2 heures, puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires étaient des anticorps anti-lapin ou anti-souris conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Promega, Madison, WI, USA).

Les anticorps suivants ont été utilisés : un anticorps monoclonal de lapin anti-PARP1 clivé [E51] (1:1000 ; Abcam, Toronto, ON, Canada) ; un anticorps anti- $\beta$ -actine de lapin (1:1000 ; Cell Signaling Technology, MA, USA); un anticorps anti-Lamin A/C de lapin (1:1000 ; Cell Signaling Technology, MA, USA) et un anticorps anti-angiogénine ANG I (C-1) de souris (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA). Les anticorps secondaires étaient des anticorps de peroxydase de raifort

conjugués à un âne anti-lapin (1:2500, Promega, Madison, WI, USA) ou de souris IgG (1:2500, Promega). La détection a été réalisée en utilisant la méthode de chimiluminescence améliorée à l'aide du substrat Clarity™ Western ECL (Bio-Rad Laboratories). Les membranes d'immunobuvardage de type Western ont été examinées et les images ont été capturées à l'aide d'un système ImageQuant LAS 500 (GE HealthCare) du Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie de l'INRS. Les résultats représentent au moins un triplicata d'expériences indépendantes.

#### **2.4.5 Analyse des fragments de ARNt**

L'activité cytoprotectrice de l'angiogénine humaine (hANG) contre le stress a été déterminée par le clivage du ARNt dans le cytosol en présence d'un agent de stress cellulaire, l'arsénite de sodium (Yamasaki et al., 2009). Tout d'abord, les cellules ont étéensemencées pendant une nuit dans des plaques à 6 puits (SARSTEDT) à une densité de 750 000 cellules/puits. Le jour suivant, les cellules ont été placées dans un milieu EMEM sans sérum pendant 1 heure avant de procéder aux étapes expérimentales. Les cellules ont été initialement traitées avec 100 µM de composés (5P, Neo) pendant 1 heure. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 100 nM hANG pour l'internalisation. À l'étape suivante, les cellules ont été placées dans un milieu contenant 500 µM d'arsénite de sodium pendant 1 heure pour induire un stress cellulaire. Enfin, les cellules ont été récoltées et l'ARN total a été extrait à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La concentration d'ARN total après extraction a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000c. Enfin, l'ARN a été chargé sur un gel TBE/8M urée, 15% acrylamide, puis migré à 18W pendant 75 minutes. Ensuite, le gel a été coloré avec le colorant SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) pendant 10 minutes et lu sur un système Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories) (Figure 2.4). L'intensité de ARNti a été normalisée à l'aide du logiciel Image Lab™ version 6.1 (Bio-Rad) avec une valeur de taille de disque de 12 mm appliquée à toutes les pistes pour le traitement des données. Les résultats représentent au trois expériences indépendantes.

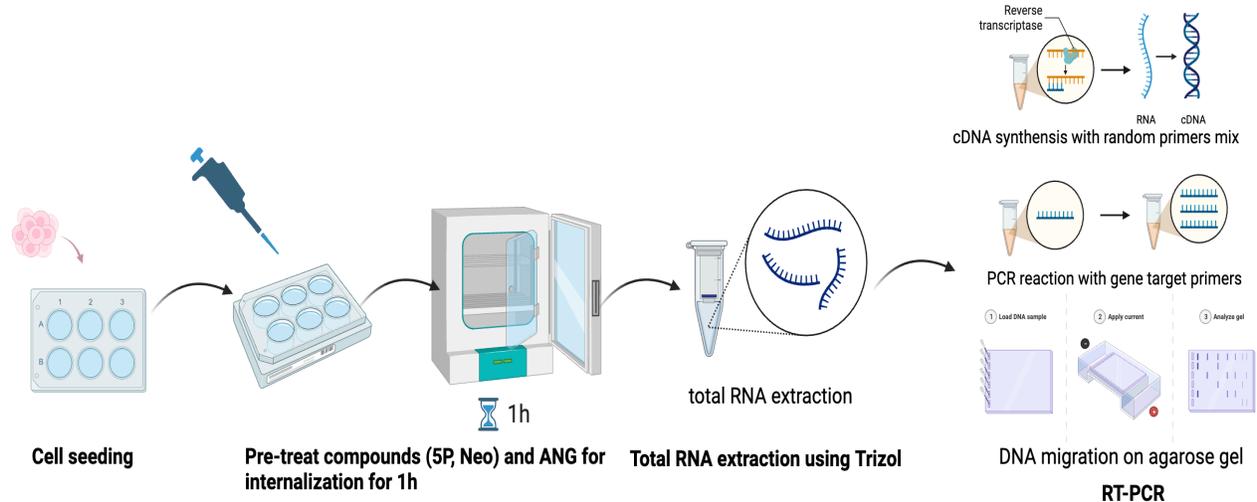


**Figure 2.4 Traitement des cellules HeLa pour l'analyse des ARNti réalisée dans la présente étude.** Figure créée à l'aide de BioRender.com.

### 2.4.6 RT-qPCR

Les cellules HeLa ont été ensemencées pendant une nuit dans une plaque à 6 puits (SARSTEDT) à une densité de 750 000 cellules/puits pour l'adhérence. Le jour suivant, les cellules ont d'abord été placées dans un milieu EMEM sans sérum pendant 1 heure, puis traitées avec 100  $\mu$ M de composés (5P, Neo) pendant 1 heure, puis incubées avec 100 nM d'hANG + composés pendant 1 heure (Figure 2.5). Le pré-ARNr 47S est connu pour être induit par hANG dans le noyau cellulaire pour favoriser la prolifération cellulaire. Pour évaluer l'expression du pré-ARNr 47S, nous avons réalisé une PCR en temps réel avec transcription inverse quantitative (RT-qPCR). L'ARN total a été extrait des échantillons traités pendant 1 heure en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen, Life Technologies) selon les instructions du fabricant. La concentration d'ARN total après extraction a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000c. Ensuite, 0,5  $\mu$ g d'ARN total ont été transcrits en ADNc à l'aide du kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (170-8841, Bio-Rad Laboratories). La qPCR a été réalisée pour détecter l'expression du gène du pré-ARNr 47S en utilisant le kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) et le système de PCR en temps réel CFX96 (Bio-Rad Laboratories). L'actine a été utilisée comme témoin interne pour chaque échantillon. Le niveau d'expression du gène cible de l'ARNr pré-47S a été normalisé par l'expression de la  $\beta$ -actine, et le niveau a été indiqué sous forme de variation relative par rapport à l'échantillon non traité (véhicule). Pour cette étude, nous avons utilisé les paires d'amorces suivantes : 47S-Forward (5'-3') CCT GCT GTT CTC TCG CGC GTC CGA G et 47S-Reverse (5'-3') AAC GCC TGA CAC GCA CGG CAC GGA G ; et  $\beta$ -actin : Actin-Forward (5'-3') : TTG CGT TAC ACC CTT TCT TG, Actin-Reverse (5'-3') : CAC CTT CAC

CGT TCC AGT TT, comme référence dans l'article de S. Li et al., 2018. Le niveau d'expression relatif du pré-ARNr 47S a été normalisé au témoin interne  $\beta$ -actin et évalué à l'aide de la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (S. Li et al., 2018).



**Figure 2.5** Traitement des cellules HeLa pour l'analyse RT-PCR réalisée dans la présente étude. Figure créée à l'aide de BioRender.com.

Les valeurs de température de rampe ont été optimisées et utilisées selon le protocole décrit ci-dessous :

**CONDITION** : 47S super-mix + 5% DMSO

**CYCLE:**

1. 95 °C pendant 1:00 min

Vitesse de rampe lente à 3,0 °C par seconde

2. 95 °C pendant 0:30 min

Vitesse de rampe lente à 2,0 °C par seconde

3. 65 °C pendant 1:00 min + Lecture de plaque

Vitesse de rampe lente à 1,2 °C par seconde

4. GOTO 2, répéter pendant 39 cycles

5. Courbe de fusion 65,0 à 97,0 °C, incrément de 0,5 °C pendant 0:05 min + Lecture de plaque

**FIN**

## 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

### 3.1 Expression et purification de l'angiogénine humaine (Objectif 1)

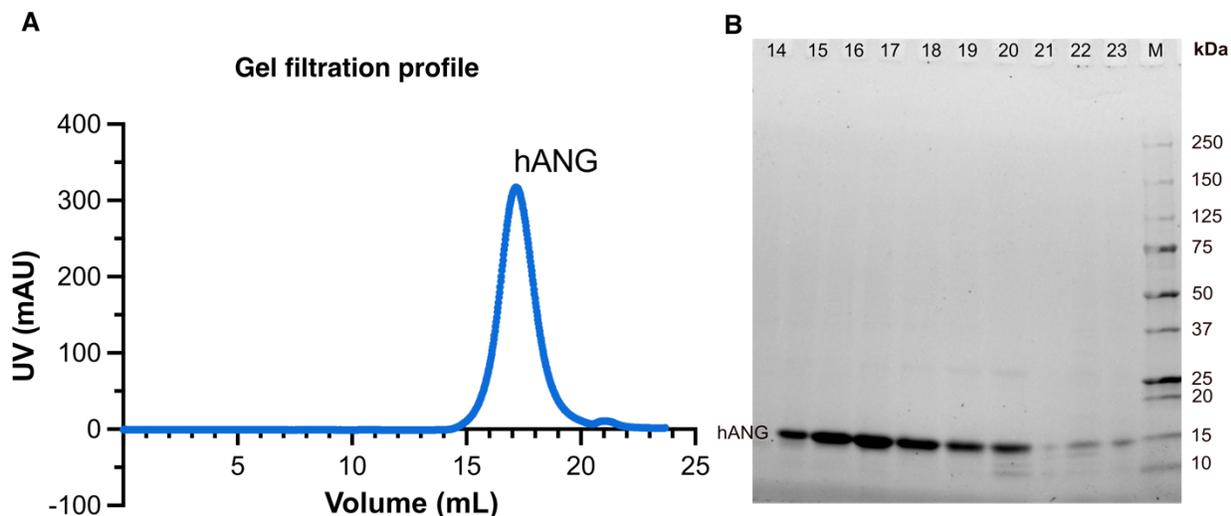
#### 3.1.1 Optimisation de l'expression et de la purification des protéines

La purification des enzymes n'était pas un résultat ciblé de l'étude, mais elle nécessitait l'optimisation du protocole établi en laboratoire pour l'expression et la purification de hANG. Cette procédure longue prend environ 20 jours du début de la culture à l'obtention de l'échantillon de protéine purifiée. hANG est une protéine avec trois ponts disulfures qui stabilisent sa structure tridimensionnelle ou tertiaire (H. H. Lee et al., 2019b). Cependant, les ponts disulfures ne peuvent pas se former lorsqu'on utilise l'environnement fortement réducteur de *E. coli* comme système d'expression, ce qui entraîne un repliement incorrect de la protéine dans la cellule bactérienne. En conséquence, hANG est exprimée sous forme de corps d'inclusion insolubles et doit être repliée *in vitro* pour atteindre la conformation spatiale correcte. Cependant, en utilisant des processus de renaturation de protéines antérieurs (Pinoteau, 2019), nous avons constaté que hANG avait tendance à s'agréger pendant le repliement et la dialyse, entraînant des rendements de production très faibles (environ 0,5 mg de hANG pour 400 mL de solution de culture). Nous avons identifié deux étapes qui contribuaient principalement à la perte de protéines : l'étape de concentration de la protéine après le repliement et l'étape d'échange de tampon de dialyse avant la purification.

Pour optimiser la composition du tampon de repliement des protéines, nous avons d'abord utilisé la méthode de goutte-à-goutte avec agitation (Moghadam et al., 2015), avec un rapport de dilution de la protéine dans le tampon de repliement de 1:100. Sous l'action d'un barreau d'agitation, la protéine était uniformément dispersée dans la solution. Cependant, nous avons observé l'agrégation de la protéine au fil du temps, en particulier pendant l'étape de dialyse. Nous avons émis l'hypothèse que pendant le processus de repliement et la formation de ponts disulfures dans un environnement oxydé/réduit de glutathion, l'équilibre thermodynamique créait potentiellement des ponts disulfures intermoléculaires entre les molécules de hANG, en plus de favoriser la stabilisation de paires de ponts disulfures incorrectes. En effet, en raison des réactions de combinaison aléatoire impliquant de nombreux résidus de cystéine, la possibilité de former des liaisons croisées entre les cystéines de différentes molécules de hANG a été considérée comme non négligeable. Pour minimiser ce phénomène, nous avons ajouté 5% de glycérol au tampon de repliement pour augmenter la viscosité et réduire la mobilité des protéines libres (Alibolandi &

Mirzahoseini, 2011), réduisant ainsi la création de ponts disulfures réticulés entre les protéines. Le glycérol est également connu pour augmenter la stabilité des protéines à toutes les concentrations (Alibolandi & Mirzahoseini, 2011).

Le processus de dialyse devait également être optimisé, car les protéines avaient tendance à être instables et à s'agréger facilement lors du changement de solution du tampon de repliement vers le tampon de purification. Une perte rapide de L-arginine, un agent stabilisateur essentiel du tampon de repliement, a été à l'origine de ce phénomène. La L-arginine est importante pour stabiliser la structure des protéines (Alibolandi & Mirzahoseini, 2011), agissant via des interactions ioniques, en particulier avec les acides aminés et les groupes carboxyles des protéines. Cela permet à la L-arginine de maintenir la structure des protéines en créant des liaisons ioniques ou d'autres interactions (Gupta & Uversky, 2024; Tsumoto et al., 2004). Cependant, l'élimination rapide de L-arginine pendant la dialyse a déstabilisé hANG. Pour surmonter ce problème, nous avons progressivement éliminé la L-arginine en l'ajoutant au tampon de dialyse et en réduisant progressivement sa concentration à chaque échange de tampon. Notre procédure a permis de purifier hANG avec succès (Figure 3.1). Le taux de rendement de production est passé de 0,5 mg initialement à 6 mg de hANG purifiée pour chaque 400 mL de culture bactérienne induite par rapport à la méthode de Pinoteau (2019). La quantité de protéine a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000c (INRS), tel que décrit à la section 2.3.1. Malgré l'obtention de rendements significativement plus élevés que les procédures précédentes (Pinoteau, 2019), nous continuons d'observer de légères pertes de rendement causées par la précipitation de protéine aux étapes de repliement et de dialyse. Une optimisation pour une meilleure efficacité de récupération pourrait encore être effectuée pour répondre aux exigences des expériences nécessitant de grandes quantités de protéines de haute pureté, telles que la cristallisation.



**Figure 3.1 Expression et purification de hANG.** A. Chromatogramme de filtration sur gel. B. Vérification du poids moléculaire de hANG par SDS-PAGE 4-20%. Les puits de gel 14-23 correspondent à l'ordre des fractions obtenues lors de la purification des protéines à l'aide d'une colonne de chromatographie par filtration sur gel. Chaque puits correspond à une fraction de 1 mL. Les fractions d'élution 14 à 23 ont été sélectionnées pour l'analyse sur gel SDS-PAGE. M: marqueur de poids moléculaire des protéines.

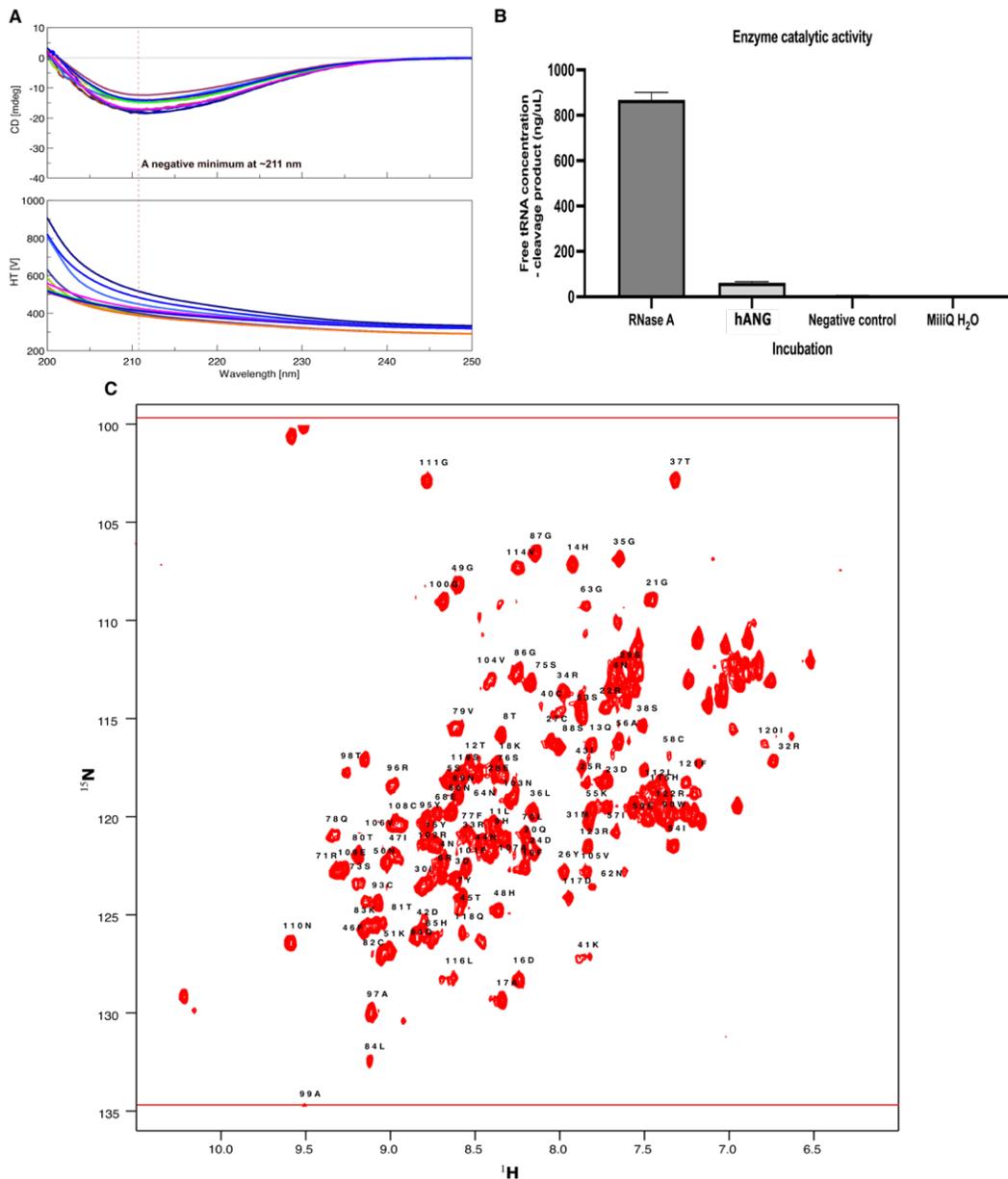
### 3.1.2 Confirmation du repliement des protéines

#### 3.1.2.1 Dichroïsme circulaire

Après l'expression et la purification, nous avons étudié le repliement structural de hANG à l'aide du dichroïsme circulaire (DC). Cette méthode peut mesurer les différences d'absorption de la lumière entre les structures secondaires des protéines, comme les hélices alpha et les feuillets bêta, fournissant des informations sur le repliement global d'une protéine en solution. Les tracés de DC peuvent discriminer entre les structures secondaires telles que les hélices alpha, les feuillets bêta, les coudes et les pelotes statistiques. Ils peuvent également refléter les changements structuraux pour donner suite à des modifications de l'environnement, du pH, de la température ou de l'influence d'autres composés dans le milieu, fournissant des informations sur les changements structuraux globaux subis par une protéine en solution (Greenfield, 2007).

Nous avons utilisé le DC pour vérifier si hANG était correctement repliée. Nous avons comparé les spectres DC de hANG aux données précédentes recueillies sur cette enzyme et les RNases homologues dans notre laboratoire. Nos mesures ont été effectuées dans la plage de longueurs d'onde de 200 à 250 nm, comme défini par notre spectropolarimètre J-815, qui a une limite de tension (valeur HT[V]) de 0 à 1000 appliquée à un tube photomultiplicateur. Comme prévu, cela

a entraîné un dépassement de la limite du signal DC aux longueurs d'onde inférieures à 200 nm. Les résultats devraient montrer un pic négatif à 190 nm pour les hélices  $\alpha$  et un pic négatif autour de 195 nm pour les feuillets  $\beta$  (Rogers et al., 2019). Nos résultats ont montré que hANG présente un maximum négatif à une longueur d'onde de 211 nm (Figure 3.2 A), indiquant une structure mixte de chaînes, d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ , conforme aux propriétés structurelles connues de hANG, qui comprend sept feuillets  $\beta$  et quatre hélices  $\alpha$  (voir la section 1.2). Fait important, aucun signal de protéine en pelote statistique (valeur DC minimale à 200 nm) n'a été détecté, indiquant que hANG semble être correctement repliée. Pour s'assurer que la protéine était correctement repliée et fonctionnelle, nous avons également évalué son activité catalytique avec le substrat d'ARNt de levure et effectué une analyse spectrale 2D-RMN.



**Figure 3.2 Renaturation et caractérisation préliminaires de hANG** A. Spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire montrant un maximum négatif à une longueur d'onde de 211 nm, indiquant une structure mixte de chaînes, d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ , conforme aux propriétés structurales connues de hANG. La concentration de hANG est de 20  $\mu$ M dans un tampon d'acétate de sodium 15 mM, pH 5,0 et les différentes couleurs de spectres correspondent aux résultats d'analyses de dichroïsme circulaire (DC) de différents échantillons de hANG. Ces résultats montrent des similitudes claires entre nos résultats et l'expression de hANG précédemment effectuée dans le labo Doucet. B. Test enzymatique comparant le clivage du substrat ARNt par hANG et RNase A. L'ARNt à une concentration de 2 mg/ml a été utilisé dans un tampon de réaction (33 mM HEPES, 33 mM NaCl, pH 7.5), alors que hANG ou RNase A ont été utilisées à une concentration de 300 nM. Des contrôles négatifs correspondant au tampon de dilution de RNase + ARNt sont présentés pour vérifier le bruit de fond du tampon de dilution RNase, alors que H<sub>2</sub>O MiliQ est utilisé pour en vérifier le bruit de fond de base. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes. C. Spectre RMN <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC de 100  $\mu$ M hANG dans 15 mM d'acétate de sodium, pH 5,0.

### 3.1.2.2 Analyse spectrale 2D-RMN

Pour déterminer si hANG était correctement repliée, nous avons également effectué une expression de hANG marquée au  $^{15}\text{N}$ , suivie d'une purification, avant de la soumettre à une investigation RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC. Les échantillons de protéines marquées au  $^{15}\text{N}$  ont été analysés à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker 600 MHz (INRS) équipé d'une sonde cryogénique à triple résonance. La protéine  $^{15}\text{N}$ -hANG a été préparée à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  dans 15 mM d'acétate de sodium à pH 5,0. Des spectres bidimensionnels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ont été enregistrés pour faciliter l'attribution des résonances du squelette peptidique, qui ont été obtenues à partir de l'entrée BMRB 26748. NMRbox a été utilisé pour traiter tous les spectres contenant les outils NMRPipe et CcpNmr Analysis. L'analyse spectrale 2D-RMN nous permet de déterminer si une protéine a été correctement repliée. Dans des conditions de tampon prédéterminées, cela se fait en observant si les attributions des pics de résonance de la protéine sont correctement dispersées et positionnées par rapport aux attributions de résonance publiées. Nous avons réussi à attribuer les pics de résonance  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correspondant aux résidus  $^{15}\text{N}$ -hANG, comme référencé précédemment dans (Tsika et al., 2016) (Figure 3.2 C). Cela a confirmé que notre protocole expérimental nous a permis de produire une hANG recombinante correctement exprimée et correctement repliée pour des analyses expérimentales supplémentaires.

### 3.1.2.3 Activité catalytique

Nous avons également utilisé un substrat d'ARNt de levure pour vérifier si notre hANG recombinante exprimée et repliée était catalytiquement active. La réaction enzymatique a été réalisée en incubant hANG et l'ARNt dans un tampon de réaction et arrêtée avec du nitrate de lanthane et de l'acide perchlorique avant la mesure sur un spectrophotomètre Nanodrop 2000c (voir la section expérimentale). Une concentration élevée de clivage d'ARNt indique une forte activité catalytique de RNase. Les niveaux de clivage d'ARNt induits par hANG ont été comparés aux taux de clivage obtenus avec l'homologue structural RNase A, qui est hautement actif (Figure 3.2 B). Bien que l'ARNt de levure ne soit pas un substrat homogène idéal pour une investigation enzymatique détaillée des RNases puisqu'il contient plusieurs sites de clivage distincts, il reste un substrat analytique rapide et très fiable pour examiner rapidement la capacité catalytique des RNases. Nos résultats montrent que hANG peut catalyser le clivage de l'ARNt, mais à un taux beaucoup plus faible par rapport à la RNase A. Cela est assez similaire aux évaluations précédentes montrant que l'activité catalytique de hANG est jusqu'à  $10^5$  fois plus faible que celle de la RNase A et d'autres membres homologues de cette superfamille (Leland et al., 2002; Shapiro et al., 1986).

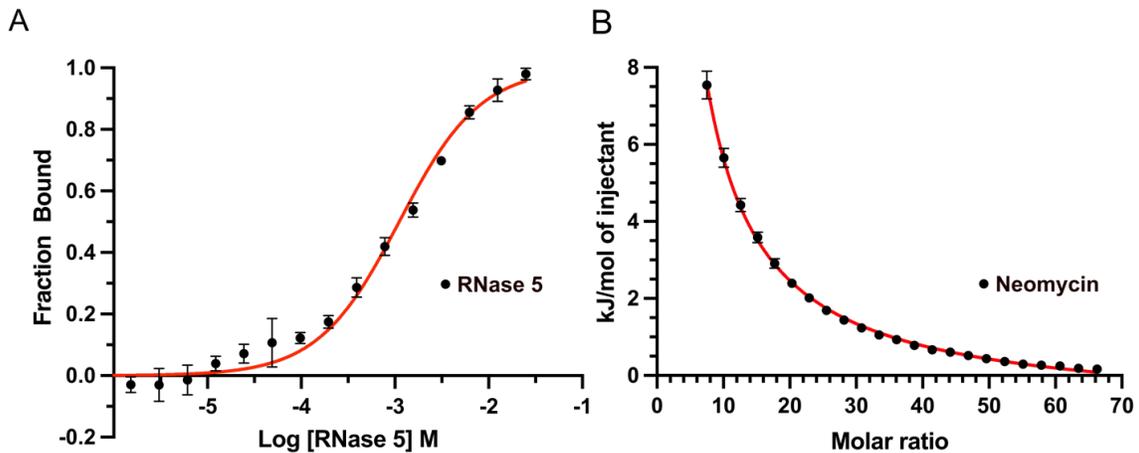
## 3.2 Étude *in vitro* de l'affinité de liaison des fragments ciblant hANG (Objectif 2)

### 3.2.1 Thermophorèse à l'échelle microscopique (MST) et calorimétrie de titration isotherme (ITC)

Après avoir identifié des petites molécules potentielles qui pourraient agir comme modulateurs prometteurs de hANG, nous avons mené des expériences de MST et d'ITC pour déterminer les affinités de liaison de ces composés candidats pour hANG. La MST a été réalisée avec hANG marquée au Cy5 en suivant le protocole fourni par le fournisseur (NanoTemper Technologies) (voir les détails dans Matériel et Méthodes). Les résultats montrent que l'affinité de liaison entre hANG et Neo était d'environ 1,1 mM, un résultat confirmé par l'ITC (environ 880  $\mu$ M). Dans l'ensemble, Neo a présenté une affinité de liaison relativement faible dans la gamme des centaines de micromolaires avec hANG. Malgré cette faible affinité de liaison, des études antérieures ont montré que Neo peut toujours avoir un impact sur la translocation nucléaire de hANG (Hu, 1998; Xia et al., 2015). Par conséquent, Neo reste un composé de contrôle prometteur à utiliser dans les essais cellulaires, à condition que la concentration utilisée soit suffisamment élevée. Sur la base de la concentration de saturation de Neo avec hANG dans les expériences de MST et d'ITC (rapport molaire de 1:60) (Figure 3.3), nous avons utilisé ce rapport molaire dans les expériences RMN ultérieures pour déterminer le site de liaison potentiel de Neo sur hANG (voir ci-dessous).

Compte tenu de la plus faible solubilité des composés 5P et 5F, le DMSO a été utilisé comme solvant standard pour préparer les solutions mères de composés dans la découverte de médicaments (Feoli et al., 2024). Comme observé précédemment (Feoli et al., 2024), nous avons constaté que le DMSO peut avoir un impact significatif sur la détermination de l'affinité de liaison entre les protéines et les composés. Bien que le DMSO (jusqu'à 5% dans nos essais) n'ait pas affecté la stabilité du signal fluorescent dans les mesures de MST, il a contribué à des changements dans le déplacement thermophorétique de hANG. En effet, nous avons observé différents déplacements du signal fluorescent des échantillons de hANG subissant la thermophorèse en présence et en absence de DMSO. Pour éliminer l'effet du DMSO sur le signal de liaison, nous avons essayé de maintenir la même concentration de DMSO dans tous les échantillons, y compris les échantillons sans ligand. Cependant, nous n'avons pas pu observer de signal de liaison avec hANG à la concentration maximale de 5% (équivalent à 500  $\mu$ M de 5P et 5F).

De même, lors de l'utilisation de l'ITC, les résultats ont montré que le DMSO a causé un signal de liaison non spécifique et important avec hANG. Comme l'ITC se base sur la mesure des changements de chaleur au fil du temps causés par les événements de liaison, il était impossible d'éliminer ce signal de liaison non spécifique causé par le DMSO dans nos échantillons. Par conséquent, nous avons dû nous fier au titrage RMN pour étudier les interactions protéine-composé.



**Figure 3.3 Affinité de liaison de hANG et de Neo calculée en utilisant A.** La thermophorèse à micro-échelle (MST) dans 50 mM de tartrate de Na/K, 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,05% de Tween 20, pH 7,0. B. La calorimétrie de titration isotherme (ITC) dans 20 mM de MES, pH 6,5. Le graphique a été construit et la constante de dissociation ( $K_D$ ) a été calculée sur la base des valeurs moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

## 3.2.2 Titrages RMN

### 3.2.2.1 Optimisation du tampon RMN

Nous avons effectué des expériences de titrage RMN avec les composés d'intérêt pour déterminer leur(s) site(s) de liaison potentiel(s) sur hANG. hANG recombinante a été exprimée dans un milieu MJ avec  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  comme seule source d'azote pour marquer la protéine à  $^{15}\text{N}$ . hANG a ensuite été purifiée davantage par chromatographie d'échange d'ions et de filtration sur gel, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Comme Neo a présenté les signaux de liaison les plus apparents avec hANG par MST et ITC, nous avons d'abord optimisé les conditions de tampon pour caractériser ce ligand par titrage RMN. Trois tampons ont été sélectionnés pour ces essais, avec  $^{15}\text{N}$ -hANG utilisé à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  : A. 15 mM acétate de sodium (NaOAc) pH 5,0, B. 50 mM Tris pH 7,0 et C. 20 mM phosphate de sodium pH 6,5. Comme il n'y avait pas de données d'attribution de pics

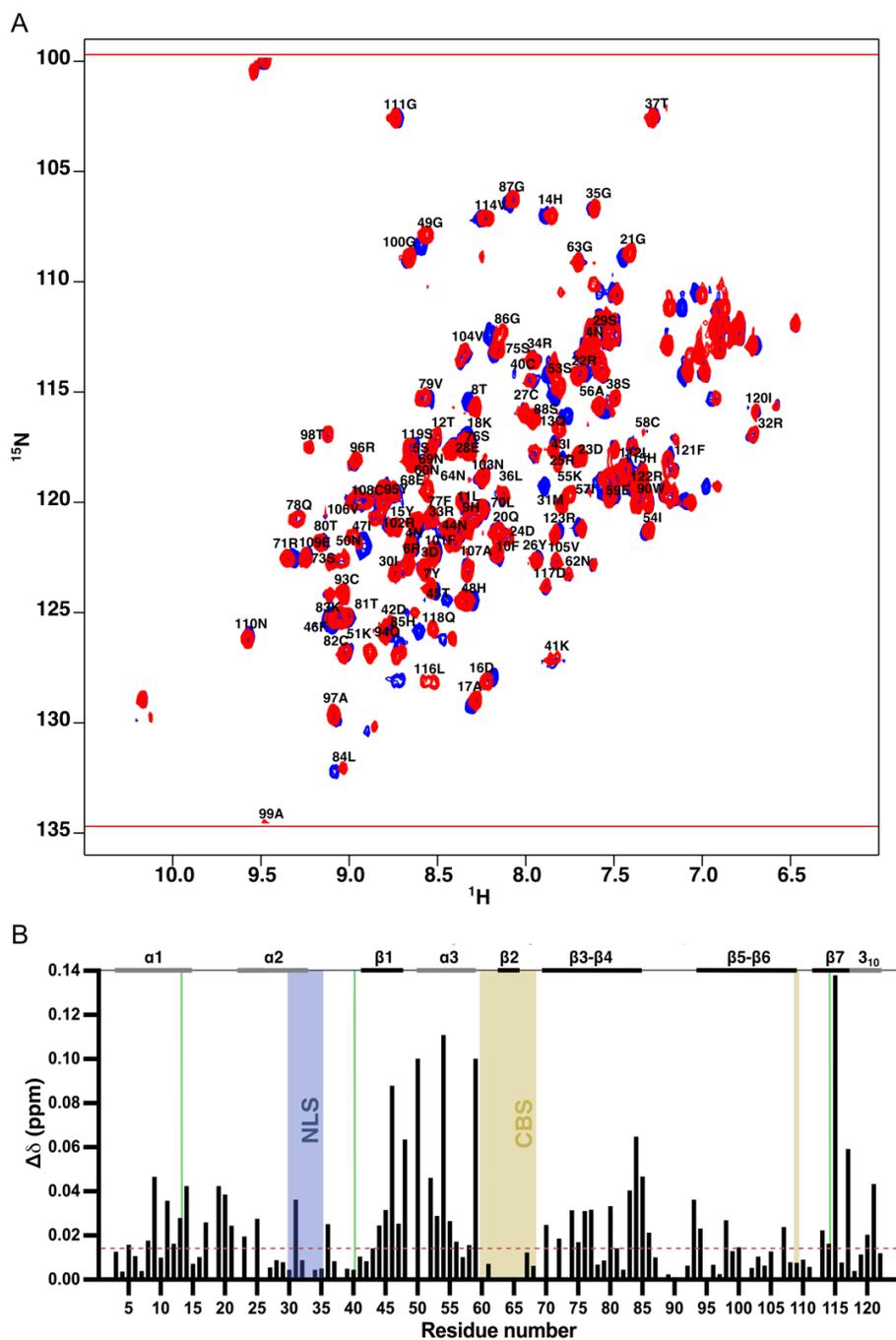
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  préexistantes dans la BMRB pour hANG dans les conditions de tampon Tris correspondantes, nous avons utilisé les attributions de pics de NaOAc (entrée BMRB 26748) et de phosphate de sodium (entrée BMRB 50650) pour extrapoler les attributions de pics dans le tampon Tris. Nos expériences d'optimisation de tampon RMN ont révélé des différences dans les signaux de liaison protéine-ligand dans ces conditions de tampon (Figure S1, S2 & S3 en annexe). Les interactions entre la protéine et le ligand ont présenté le signal le plus transparent dans le NaOAc à pH 5,0. De plus, le site de liaison de Neo semble se regrouper autour des résidus de la poche catalytique de hANG. Ces résultats corroborent les observations précédentes de (Panda et al., 2022), qui suggèrent que Neo peut inhiber la fonction de clivage de l'ARN de hANG *in vitro*. À la lumière de ces observations, nous avons procédé aux expériences de liaison de ligands RMN subséquentes dans le tampon NaOAc.

### 3.2.2.2 Titrage RMN de fragments et de composés de petite molécule sur $^{15}\text{N}$ -hANG

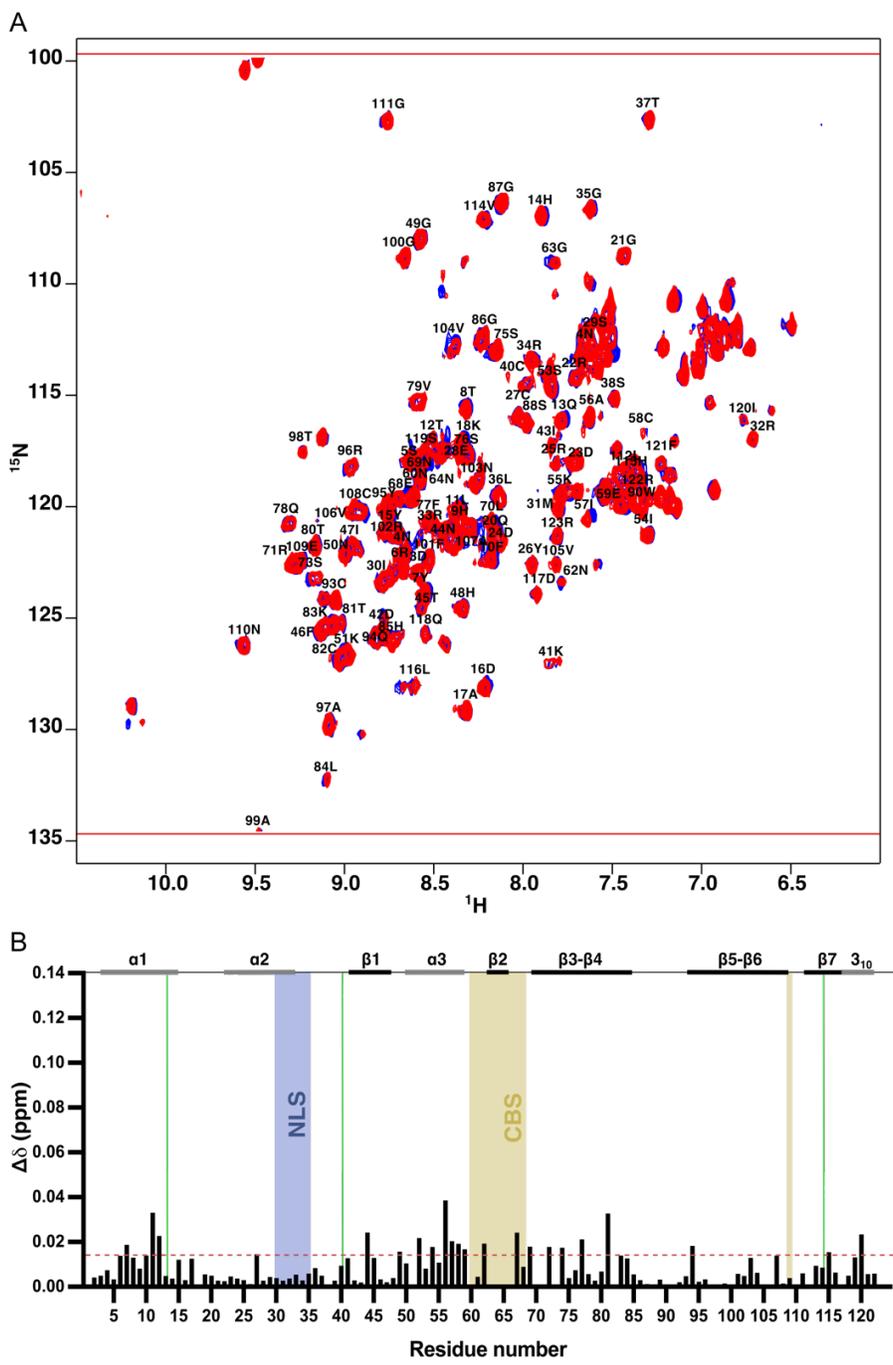
Comme décrit précédemment,  $^{15}\text{N}$ -hANG maintient deux régions critiques pour l'endocytose et la translocation : un segment de liaison cellulaire (CBS) et un signal de localisation nucléaire (NLS) (Hallahan et al., 1991; Moroianu & Riordan, 1994a). Nous avons cartographié les résidus correspondants de ces régions sur la structure secondaire de hANG (Figure 3.4 B) pour étudier si Neo, 5P et 5F interagissent avec ces régions spécifiques de hANG. Les résultats du titrage RMN pour Neo ont révélé des perturbations significatives des déplacements chimiques (CSP) de résidus spécifiques dans  $^{15}\text{N}$ -hANG (Figure 3.4). Bien que Neo soit connu pour inhiber la translocation nucléaire de hANG (Hu, 1998; Xia et al., 2015), nos titrages RMN ont montré que la région CBS a présenté des changements de déplacements chimiques relativement minimaux. En revanche, nous avons observé des perturbations significatives des déplacements chimiques pour le résidu R31 dans la région NLS. Bien que Neo ne puisse pas interagir directement avec ces deux zones considérées comme cruciales pour l'absorption cellulaire et la translocation nucléaire de hANG, il peut toujours inhiber la translocation nucléaire de hANG, potentiellement par un mécanisme allostérique.

Pour l'expérience de titrage  $^{15}\text{N}$ -hANG avec les composés 5P et 5F (Figures 3.5 et 3.6), une quantité équivalente de DMSO a été ajoutée à l'échantillon de protéine apo pour tenir compte de l'impact potentiel du DMSO sur les signaux de liaison, en veillant à ce que la concentration finale de DMSO ne dépasse pas 5%. Dans l'ensemble, au même rapport de titrage 1:60 (hANG:composés), 5P et 5F ont présenté des signaux de CSP (perturbation des déplacements chimiques) beaucoup plus faibles par rapport à Neo. Ce résultat est raisonnable sur la base des recherches antérieures effectuées par Pinoteau, 2019, qui ont montré que 5P a une très faible

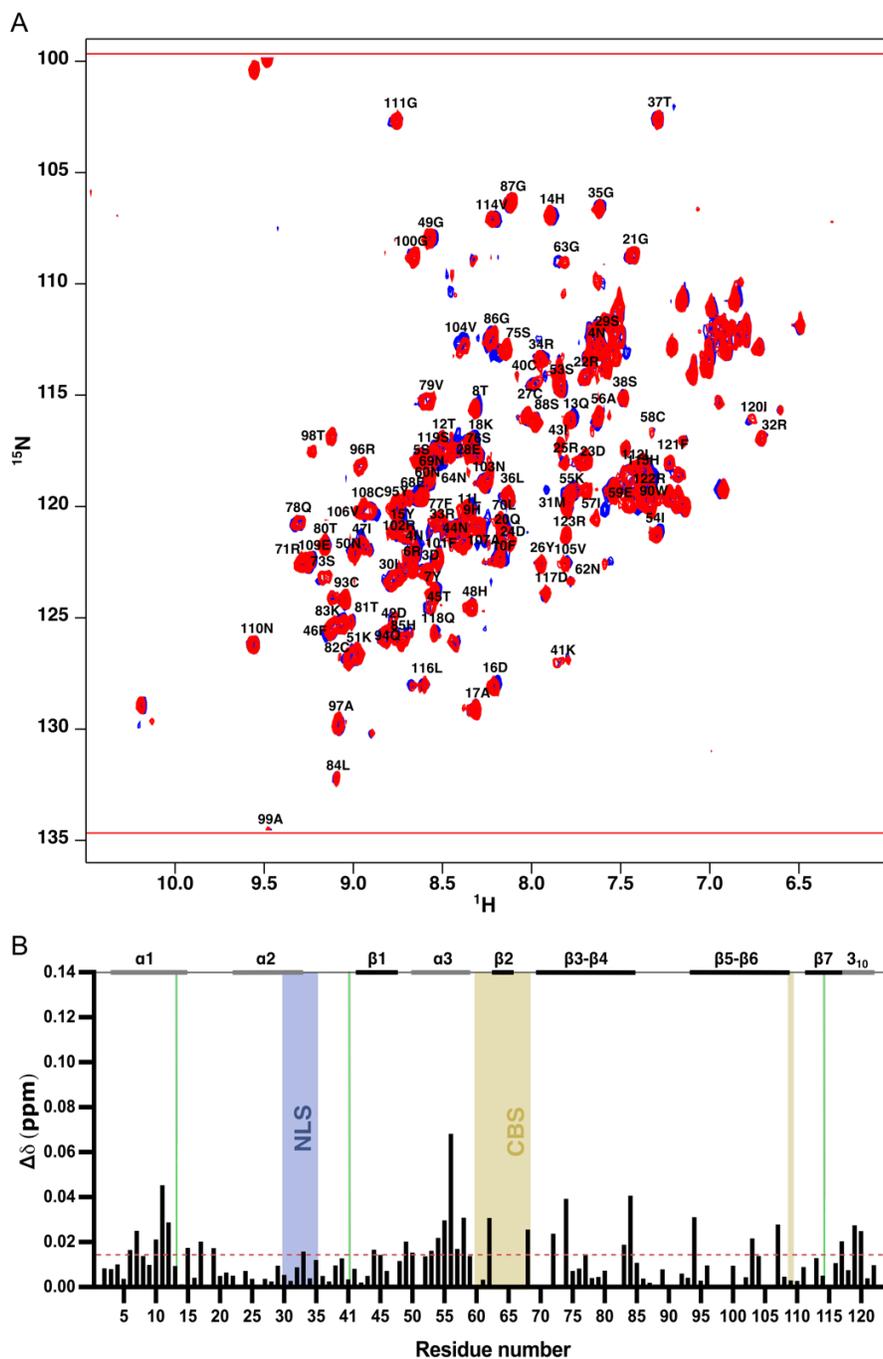
affinité de liaison ( $K_D$  dans la gamme des dizaines de mM) pour hANG. Les résultats ont montré que 5P et son analogue 5F ont suscité une réponse similaire dans les régions de résidus de hANG, comme en témoignent les changements significatifs de CSP principalement concentrés dans les hélices alpha 1 et 2 de hANG. Les CSP dans les régions NLS et CBS de hANG n'ont pas été significativement affectés (Figure 3.5 B et Figure 3.6 B). Fondamentalement, les changements de CSP des résidus induits par le titrage de hANG avec 5P et 5F semblent plus localisés, ce qui signifie que les régions affectées semblent moins importantes par rapport aux changements de CSP causés par Neo. Cela peut s'expliquer par les poids moléculaires relativement faibles de 5P et 5F (~200 Da) (Tableau 1.2), ainsi que par le fait que bien que l'affinité de Neo pour hANG soit faible, elle est encore supérieure à l'affinité de l'ordre des dizaines de mM de 5P pour hANG. Nous allons cartographier les valeurs de perturbation des CSP sur la surface 3D de hANG pour identifier les régions de liaison potentielles des composés sur hANG.



**Figure 3.4 Titrage RMN de  $^{15}\text{N}$ -hANG par Neo dans 15 mM d'acétate de sodium, pH 5,0.** Tous les échantillons ont une concentration de 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . A. Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de hANG apo (rouge) et titré par Neo (bleu) à un rapport molaire de 60:1 (Neo:hANG). B. Perturbations des déplacements chimiques composés (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de hANG en présence de Neo. Les éléments de structure secondaire de hANG sont affichés au-dessus de l'alignement : hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ , rectangles gris), brins- $\beta$  ( $\beta$ , rectangles noirs) et coude aléatoire (ligne noire fine). Les résidus actifs conservés H13, K40 et H114 sont identifiés par des barres vertes au-dessus de l'alignement. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est coloré en violet-bleu et le segment de liaison cellulaire (CBS) est coloré en jaune-brun.



**Figure 3.5 Titrage RMN de  $^{15}\text{N}$ -hANG par 5P dans 15 mM d'acétate de sodium, pH 5,0.** Tous les échantillons ont une concentration de 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . A. Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de hANG apo (rouge) et titré par 5P (bleu) à un rapport molaire de 60:1 (5P:hANG). B. Perturbations des déplacements chimiques composés (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de hANG en présence de 5P. Les éléments de structure secondaire de hANG sont affichés au-dessus de l'alignement : hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ , rectangles gris), brins- $\beta$  ( $\beta$ , rectangles noirs) et coude aléatoire (ligne noire fine). Les résidus actifs conservés H13, K40 et H114 sont identifiés par des barres vertes au-dessus de l'alignement. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est coloré en violet-bleu et le segment de liaison cellulaire (CBS) est coloré en jaune-brun.



**Figure 3.6 Titration RMN de  $^{15}\text{N}$ -hANG par 5F dans 15 mM d'acétate de sodium, pH 5,0.** Tous les échantillons ont une concentration de 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . A. Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de hANG apo (rouge) et titré par 5F (bleu) à un rapport molaire de 60:1 (5F:hANG). B. Perturbations des déplacements chimiques composés (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de hANG en présence de 5F. Les éléments de structure secondaire de hANG sont affichés au-dessus de l'alignement : hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ , rectangles gris), brins- $\beta$  ( $\beta$ , rectangles noirs) et coude aléatoire (ligne noire fine). Les résidus actifs conservés H13, K40 et H114 sont identifiés par des barres vertes au-dessus de l'alignement. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est coloré en violet-bleu et le segment de liaison cellulaire (CBS) est coloré en jaune-brun.

### 3.2.2.3 Cartographie des sites de liaison potentiels des composés chimiques sur la structure 3D de hANG

Nous avons utilisé une représentation en pâte à modeler dans PyMOL pour afficher les variations du déplacement chimique RMN sur la structure 3D de hANG, ce qui nous a permis de cartographier les sites de liaison potentiels des fragments de composés chimiques. Cette approche de visualisation met en évidence la façon dont l'épaisseur des différents motifs protéiques peut modéliser les perturbations du déplacement chimique lors de la liaison des composés 5P, 5F et Neo. Des cartouches de pâte à modeler plus épaisses indiquent des changements plus importants dans les perturbations du déplacement chimique (CSP,  $\Delta\delta$  ppm), qui correspondent aux zones subissant des changements structurels dus aux interactions avec les ligands et/ou aux changements environnementaux. Cette méthode aide à visualiser les régions de la protéine impactées par diverses interactions ou conditions changeantes. De plus, nous avons cartographié les CSP qui reflètent les changements dans les perturbations du déplacement chimique à l'aide d'une échelle de gradient bleu-blanc-rouge, correspondant à l'amplitude croissante des CSP en présence des composés (Figure 3.7). Projeter ces changements sur la structure 3D de hANG aide à identifier le(s) site(s) de liaison potentiel(s) de ligands distincts.

- Titration RMN de hANG avec Neo

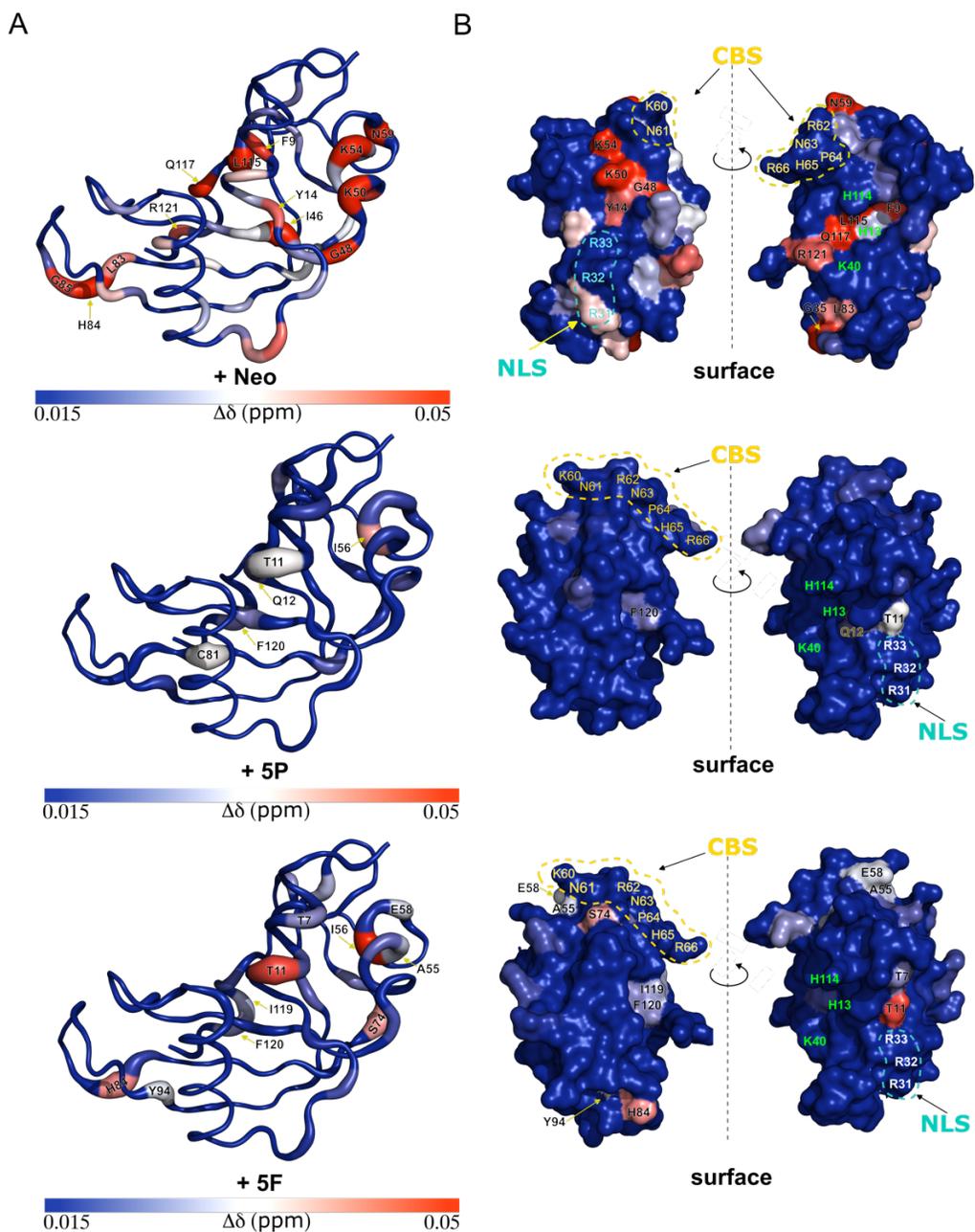
À un rapport molaire de 1:60 (hANG:Neo), nous avons observé que Neo cible la poche catalytique de hANG (Figure 3.7 C). Neo ne perturbe pas de manière significative les CSP des trois résidus catalytiques de hANG (H13, H114 et K40), le plus impacté étant le résidu catalytique principal H13 (0,03 ppm). Cependant, les résidus situés sur le bord de la poche catalytique (F9, L115, Q117, R121) présentent des perturbations notables du déplacement chimique. Cela suggère que Neo peut potentiellement agir comme un inhibiteur compétitif en ciblant les résidus au sein de la poche catalytique de hANG, sans nécessairement interagir directement avec la triade catalytique (H13, K40, H114). Nos observations RMN sont cohérentes avec les résultats rapportés par Panda et al., 2022, selon lesquels le potentiel inhibiteur de Neo sur l'activité catalytique de dégradation de l'ARN de hANG se produit dans la poche catalytique de hANG. Leurs résultats de docking n'ont pas montré que Neo se lie dans ou à proximité de la poche catalytique de hANG (Panda et al., 2022). En revanche, nos résultats expérimentaux RMN démontrent que Neo peut en effet cibler le voisinage immédiat de la poche catalytique de hANG en perturbant les déplacements chimiques des résidus F9, L115, Q117 et R121.

De plus, nous avons identifié un autre site de liaison potentiel pour Neo à la surface de hANG (Figure 3.7 C), incluant les résidus T11, Y14 (hélice 1) ; et G48, K50, S52, K54 (hélice 3). Cette région est également située en dehors de la poche catalytique de hANG, avec trois résidus (T11, Y14, K50) cohérents avec les résultats de docking précédents de Neo (Panda et al., 2022). Nos expériences de titrage RMN n'ont pas mis en évidence de perturbations significatives du déplacement chimique dans la région NLS de hANG (R31, R32, R33), qui est connue pour être impliquée dans la translocation nucléaire de hANG ; ou la région CBS de hANG ( $^{60}\text{KNRNPHR}^{66}$ ).

Néanmoins, nous avons observé des perturbations significatives des déplacements chimiques à la position N59, qui se situe à proximité du site CBS de hANG, mais assez éloignée du second site potentiel de liaison de Neo sur hANG (T11, Y14, G48, K50, S52, K54). Bien qu'il soit possible que les réseaux de résidus dans hANG jouent un rôle dans la communication allostérique et entraînent des perturbations significatives des déplacements chimiques à longue distance avec le résidu N59, le CSP de N59 pourrait également être affecté par des changements dans l'environnement chimique ou des modifications dans la structure ou la dynamique des protéines. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre cette observation ; néanmoins, ces résultats représentent la première caractérisation expérimentale des changements structuraux induits par la liaison de Neo à hANG.

- Titrage RMN de hANG avec 5P; et 5F

Le titrage RMN de hANG avec 5P et 5F a montré qu'au ratio le plus élevé de 1:60 (hANG:5P), des CSP relativement faibles ont été induits (Figure 3.7 A), ce qui correspond à des affinités très faibles de 5P et 5F, que nous n'avons pas pu déterminer avec précision par ITC ou MST (section 3.2.1). Les résidus affectés par les CSP correspondants, cartographiés sur la structure 3D de hANG, suggèrent que 5P ne semble pas se lier à la poche catalytique de hANG. De plus, nous avons identifié les deux régions de liaison uniques connues à la surface de hANG, à savoir NLS et CBS (Figure 3.7), confirmant que 5P n'a présenté aucun signal de ciblage pour ces régions de hANG non plus. Bien que limités par les faibles affinités de liaison de ces composés, les résidus de surface présentant néanmoins des perturbations significatives des déplacements chimiques en présence de 5P ont été trouvés aux positions T11, Q12 et F120. De même, les expériences de titrage RMN avec 5F, un analogue de 5P, ont montré des perturbations notables des déplacements chimiques pour les résidus T6, T11 (hélice a1); A55, E57 (hélice a3); S74, H84 (b-brin b3-b4); et Y94 (Figure 3.7 B).



**Figure 3.7 Sites de liaison potentiels des composés Neo, 5P et 5F sur la structure de hANG basés sur les perturbations composées des déplacements chimiques  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  RMN.** A. Les perturbations des déplacements chimiques (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) pour chaque résidu sont indiquées à la fois par la couleur et la largeur du modèle en pâte (coloré sur une plage bleu-blanc-rouge) : facteur min 0,015 ppm, facteur max 0,05 ppm. B. Surface colorée de hANG montrant les perturbations des déplacements chimiques qui illustrent les sites de liaison potentiels des composés. La surface des résidus actifs conservés H13, K40 et H114 est identifiée par des étiquettes vertes. La région NLS ( $^{31}\text{RRR}^{33}$ ) est indiquée par le cercle en pointillés cyan, et la région CBS ( $^{60}\text{KNRNP}^{66}$ ) est marquée par le cercle en pointillés orange. Les résidus montrant des valeurs de CSP significativement modifiées sont désignés par des étiquettes noires à côté de leurs positions respectives dans la séquence d'acides aminés. La figure a été réalisée avec PyMOL (version Open-Source 2.5.0) en utilisant la structure de hANG (PDB : 1B1I).

Notamment, tous ces résidus sont situés en dehors des régions essentielles fonctionnellement connues de hANG, telles que la poche catalytique, le NLS ou le CBS. 5F a également induit des perturbations des déplacements chimiques à la position I56, comme 5P (ce résidu n'est pas à la surface de hANG), suggérant que hANG subit un certain niveau de réorganisation conformationnelle lors de la liaison au ligand. Comme démontré précédemment sur des membres homologues de cette famille d'enzymes RNase, hANG pourrait également être soumise à une communication allostérique (Bernard et al., 2023; Narayanan et al., 2018; Tran et al., 2024). Cette hypothèse nécessite des explications supplémentaires par le biais d'analyses approfondies, en plus de la prise en compte des changements dans l'environnement chimique ou dans la dynamique des protéines en présence des composés (5P, 5F).

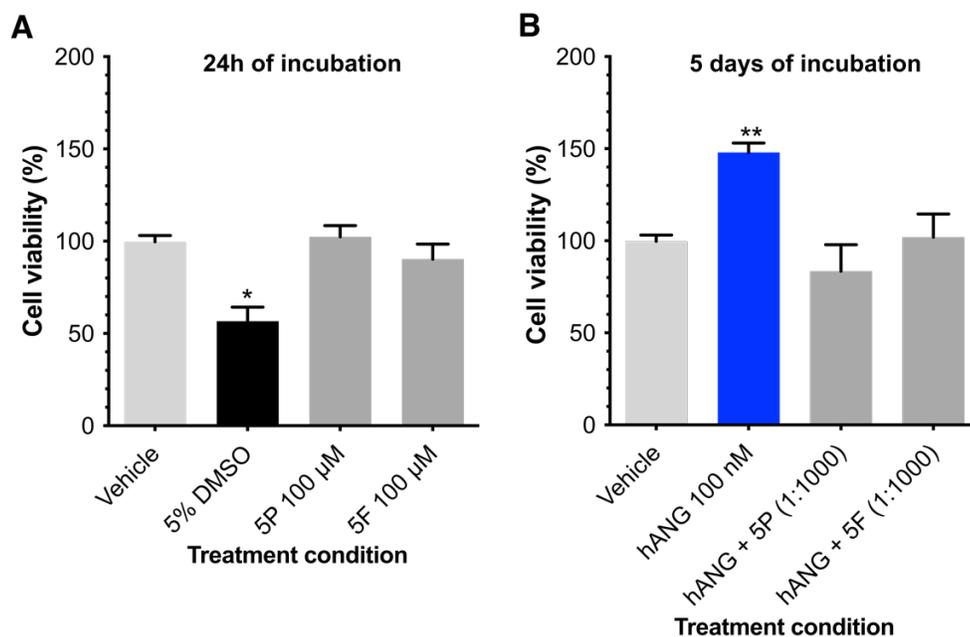
### **3.3 Évaluation de l'activité de l'angiogénine lors de la modulation de sa localisation subcellulaire dans les cellules HeLa (Objectif 3)**

Les cellules HeLa ont été sélectionnées pour plusieurs raisons clés en tant que système cellulaire modèle. En plus des observations de la littérature antérieure (Pinoteau, 2019), les membres de l'équipe de notre laboratoire ont précédemment observé une activité stimulant la prolifération cellulaire causée par hANG sur les cellules HeLa, qui est une fonction importante documentée de hANG. Cela indique que les cellules HeLa sont un outil adapté pour étudier les mécanismes cellulaires de l'activité de hANG. De plus, les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse bien établie largement utilisée dans divers contextes expérimentaux pour étudier les voies de signalisation intracellulaire, démontrant sa fiabilité et sa stabilité en tant que modèle cellulaire. De plus, de nombreux exemples de la littérature ont démontré les mécanismes d'action de hANG dans les cellules HeLa (Chen et al., 2019; Thomas et al., 2018; Y. N. Wang et al., 2018; Wei et al., 2011; J. Xu et al., 2021). Ces observations ont facilité la comparaison de nos résultats avec les mécanismes généraux. Ces facteurs ont collectivement démontré que les cellules HeLa constituent un modèle approprié et bien établi pour étudier certaines des fonctions biologiques de hANG. En plus de leur croissance rapide et de leur comportement idéal en culture, elles sont également connues comme un outil essentiel et fiable dans la recherche biomoléculaire et cellulaire.

### **3.3.1 Évaluation des effets des fragments de composés chimiques sur la viabilité des cellules HeLa et la prolifération cellulaire induite par hANG**

Pour déterminer les concentrations appropriées d'enzyme et de composés à utiliser pour les essais cellulaires ultérieurs, nous avons d'abord mené des expériences pour évaluer les effets des composés 5P et 5F sur la viabilité cellulaire des cellules HeLa. Les cellules ont été exposées aux composés pendant 24 heures pour en évaluer une possible toxicité à court terme. Le DMSO (5%) a été utilisé comme témoin positif de cytotoxicité. La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du réactif Cell-Titer Blue et les résultats ont été analysés sur un lecteur de plaque TECAN (INRS). Les expériences ont été réalisées en triplicata et des statistiques ANOVA à un facteur ont été obtenues. Les résultats ont montré que 5P et 5F n'ont pas d'impact significatif sur la viabilité cellulaire à des concentrations allant jusqu'à 100  $\mu$ M après 24 heures d'exposition (Figure 3.8 A). En revanche, un échantillon témoin cytotoxique positif avec 5% de DMSO a présenté une diminution de 50% de la viabilité cellulaire après 24 heures. Sur la base de ces résultats, nous avons utilisé des concentrations allant jusqu'à 100  $\mu$ M de composés pour toutes les expériences ultérieures. Cela évite d'observer les effets des composés sur la localisation de hANG dans des conditions où la viabilité cellulaire serait compromise.

Dans les expériences suivantes, nous avons vérifié qu'un traitement avec hANG exogène pouvait induire un effet sur le nombre de cellules HeLa viables. Les résultats précédents du laboratoire (Pinoteau, 2019), suggérait un effet de hANG à une concentration de 100 nM. Sur la base de la corrélation relative du ratio hANG:composé de 1:60 de nos essais standard de RMN, nous avons utilisé un ratio de saturation de 1:1000 pour les expériences de prolifération, nous permettant d'observer l'impact de ces composés sur l'activité de hANG. Plus précisément, hANG a été utilisée à 100 nM et les composés 5P et 5F à 100  $\mu$ M. Nos résultats montrent que hANG augmente le nombre de cellules viables dans le test. Cependant, nous avons en outre observé que 5P et 5F inhibaient l'augmentation de la viabilité cellulaire favorisée par hANG (Figure 3.8 B).



**Figure 3.8 Impact des composés 5P et 5F sur la viabilité cellulaire et la prolifération cellulaire induite par hANG.**

A. Viabilité des cellules HeLa après traitement avec 5P, 5F et 5% DMSO (comme contrôle positif de la possible toxicité à court terme). B. Prolifération des cellules HeLa induite par hANG en présence/absence de 5P et 5F. 5P et 5F ont été utilisés à la concentration de 100  $\mu$ M ; hANG a été utilisé à 100 nM dans le test. L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Le véhicule (contrôle négatif) est composé de cellules non traitées par hANG ou des composés, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la possible toxicité à court terme. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats présentés dans cette expérience soulèvent des interrogations quant aux effets de hANG sur la viabilité cellulaire. D'une part, l'augmentation du nombre de cellules vivantes observée suite au traitement avec hANG pourrait refléter la capacité de cette protéine à induire la prolifération, comme cela a été suggéré dans des études antérieures (Hoang & Raines, 2017; Tsuji et al., 2005). En effet, de nombreux travaux ont démontré que hANG peut stimuler la prolifération de différents types de cellules cancéreuses (Hu et al., 2000; Miyake et al., 2015; Tsuji et al., 2005). Cet effet prolifératif pourrait donc expliquer, du moins en partie, l'augmentation du nombre de cellules viables observée dans nos expériences.

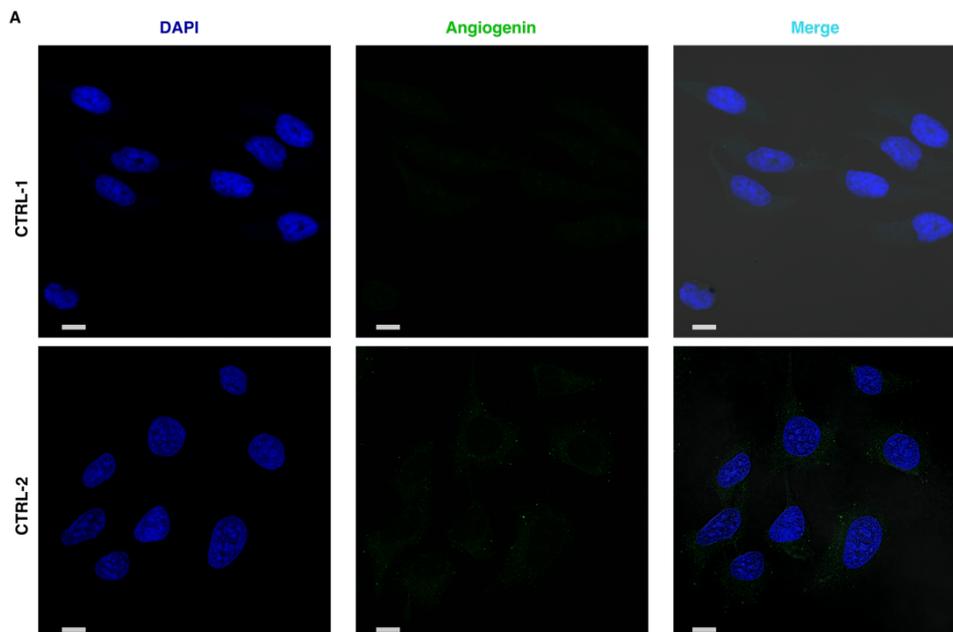
Cependant, il convient également d'explorer une hypothèse alternative. Nos expériences ayant été réalisées en conditions de privation de sérum pendant 5 jours, il est surprenant d'observer une prolifération cellulaire soutenue sur une telle durée en l'absence de facteurs de croissance. Dans ce contexte, il est envisageable que l'augmentation du nombre de cellules viables reflète plutôt un effet de protection de hANG contre la mort cellulaire programmée, plutôt qu'une véritable prolifération. En effet, de nombreuses études ont montré que hANG avait la capacité de favoriser

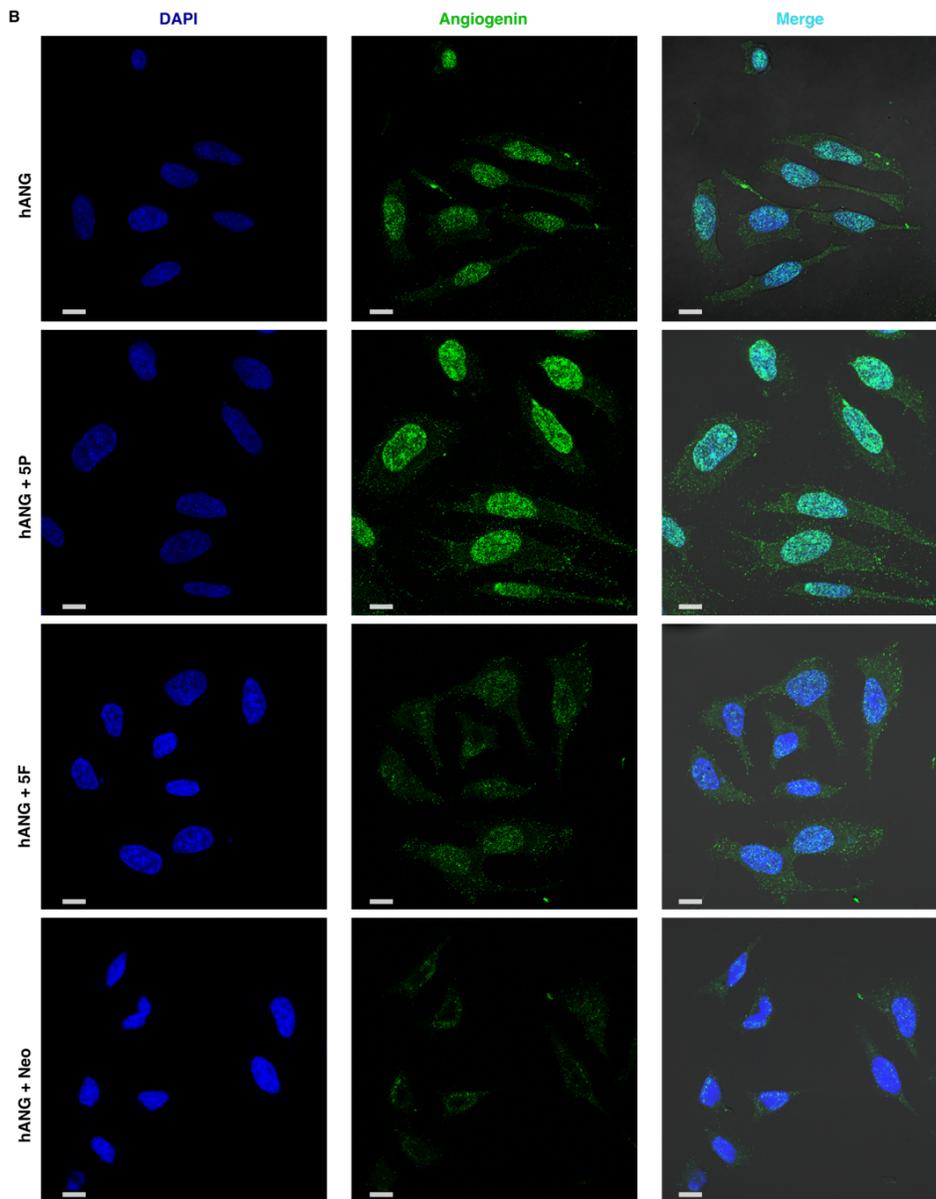
la survie cellulaire dans des conditions défavorables (Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011; S. Li et al., 2018; S. Li & Hu, 2012; Sadagopan et al., 2012; Yamasaki et al., 2009). Des analyses complémentaires, notamment en évaluant des marqueurs spécifiques de la prolifération et de l'apoptose, permettront de mieux caractériser la nature exacte de la réponse cellulaire observée.

### ***3.3.2 Évaluation des effets des fragments de composés chimiques sur la localisation subcellulaire de hANG***

Bien que nos composés aient une faible affinité pour hANG (gamme mM), nous avons ensuite choisi de poursuivre l'évaluation de leur impact sur la localisation subcellulaire de hANG dans les cellules HeLa. D'après nos connaissances, il n'existe actuellement aucun modulateur moléculaire publié de hANG qui puisse réguler son internalisation subcellulaire, offrant une avenue intéressante pour la modulation potentielle de son activité biologique. Cette expérience visait à étudier le rôle de la localisation subcellulaire de hANG dans ses fonctions biologiques et à explorer si cette activité peut être modulée en utilisant les ligands de petite taille (5F, 5P et Neo). La concentration de hANG utilisée était basée sur les analyses précédentes de notre laboratoire, qui ont évalué sa capacité à promouvoir la viabilité cellulaire à 100 nM (Figure 3.8 B). Nous avons constaté que les fragments à une concentration allant jusqu'à 100  $\mu$ M n'ont pas eu d'impact significatif sur la viabilité des cellules HeLa; cela a été démontré par la capacité de réduire le réactif Cell-titer blue en 24 heures lorsqu'elles étaient exposées aux composés (Figure 3.8 A). Nous avons choisi une concentration de 100  $\mu$ M pour les expériences avec Neo, un niveau qui impacte la translocation nucléaire de hANG et l'angiogenèse induite par hANG (Hu, 1998). De plus, les résultats de nos propres mesures de  $K_D$  par MST, ITC et titrage RMN (Section 3.2) indiquent que le ratio molaire de saturation hANG:Neo est de 1:60. Puisque nous utilisons une concentration de 100 nM pour hANG, nous avons sélectionné une concentration de 100  $\mu$ M pour Neo, ce qui correspond à un rapport molaire hANG: Neo de 1:1000, correspondant à la concentration du test cellulaire initial. Cette concentration de 100  $\mu$ M de Neo ne semble pas affecter de manière notable la viabilité des cellules HeLa, d'après les mesures effectuées avec le test de viabilité cellulaire Cell-Titer Blue après 24 heures d'incubation (Figure S4, en annexe). Nous avons évalué la translocation nucléaire de hANG dans les cellules HeLa en utilisant à la fois la microscopie confocale basée sur l'immunofluorescence (Figure 3.9); mais également un essai d'extrait nucléaire cellulaire et la vérification par immunobuvardage de type Western (Figure 3.10). Les résultats ont montré que hANG migrerait rapidement et s'accumulait dans le noyau des cellules HeLa après 1 heure. 5P a amélioré l'accumulation de hANG dans le noyau avec un changement

d'environ 2 fois par rapport aux cellules traitées avec hANG après 1 heure (Figures 3.9 et 3.10), tandis que le niveau de hANG dans le cytoplasme n'était pas significativement affecté par rapport à l'échantillon traité uniquement avec hANG (Figure 3.10). En revanche, 5F ne semble pas avoir d'effet significatif à la fois sur l'endocytose et l'accumulation de hANG dans le noyau, bien qu'il cible également hANG en tant que modulateur allostérique potentiel (Section 3.2.2). Comme décrit précédemment, Neo a été utilisé comme témoin positif pour inhiber la translocation nucléaire de hANG. Dans cette étude, nous avons constaté que Neo inhibait l'accumulation de hANG dans le noyau et le processus d'endocytose de hANG dans les cellules HeLa (Figure 3.10). Cela reste énigmatique, car nos expériences de titrage RMN (Section 3.2.2) ont montré que Neo ne semble pas cibler les régions critiques NLS et CBS liées à l'internalisation de hANG. Néanmoins, Neo cible les résidus situés à proximité immédiate de la poche catalytique de hANG, ce qui soulève l'hypothèse que la poche catalytique puisse également être une région déterminante pour les activités d'endocytose et de translocation nucléaire de hANG.

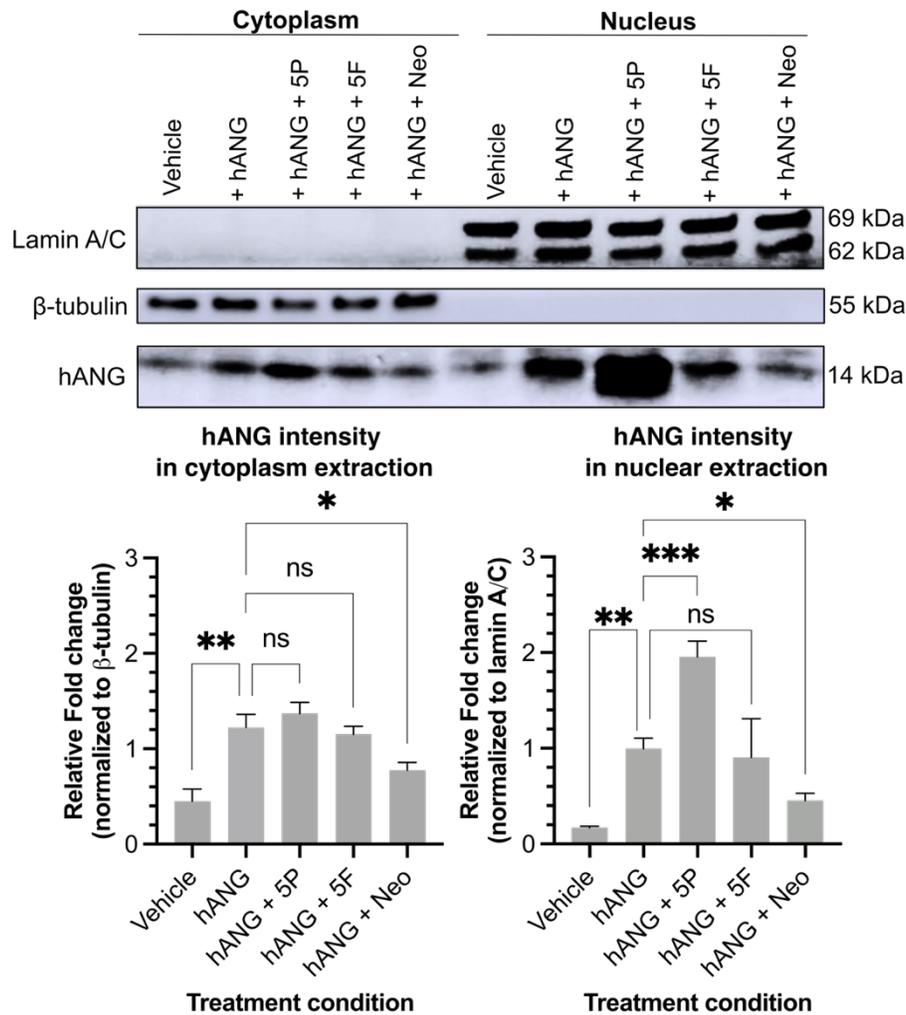




**Figure 3.9 Microscopie confocale à immunofluorescence permettant d'observer la translocation nucléaire de hANG exogène (100 nM) dans les cellules HeLa.** hANG a été visualisée en utilisant un anticorps monoclonal anti-hANG 26-2F (anticorps primaire) et un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 488 (anticorps secondaire). La présence de hANG est associée à l'intensité de la fluorescence verte, alors que les noyaux cellulaires ont été observés par une coloration bleue au DAPI. Les cellules non-traitées avec hANG ont été utilisées comme échantillons de contrôle (A), comprenant une évaluation du signal basal de fluorescence (anticorps secondaire seulement (CTRL-1)), et une évaluation du signal de liaison endogène induit par hANG ou non spécifique (anticorps primaires et secondaires (CTRL-2)). Les cellules HeLa ont été traitées avec hANG exogène et une translocation de hANG a été observée dans le noyau après une heure (B). Pour les échantillons prétraités avec de petites molécules (5P, 5F ou Neo à 100uM), hANG peut toujours transloquer dans le noyau, mais avec une modulation de la distribution cytosolique et nucléaire. Les résultats représentent trois expériences indépendantes. Les images des cellules colorées ont été acquises à partir d'au moins cinq champs, chacun contenant un minimum de 6 à 8 cellules. Barre d'échelle (gris-blanc) = 10  $\mu$ m.

En résumé, nos résultats montrent que le 5P se lie à une région à l'extérieur de la poche catalytique de hANG, renforçant ainsi l'accumulation de hANG dans le noyau. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'intensité de marquage de hANG dans le compartiment nucléaire en présence de 5P, par rapport au contrôle (non traité avec hANG). Cette observation pourrait refléter une stimulation de la translocation nucléaire de hANG induite par 5P. En l'absence de données sur la cinétique d'accumulation nucléaire de hANG et sa demi-vie dans les cellules HeLa, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que 5P favorise plutôt la stabilisation de hANG dans le noyau, en inhibant par exemple sa dégradation ou sa rétro-translocation vers le cytoplasme. Cela pourrait également expliquer l'augmentation de l'accumulation nucléaire observée. Nous proposons d'approfondir nos analyses afin de comprendre le mécanisme de cette action d'accumulation de hANG dans le noyau cellulaire. Pour ce faire, nous envisageons d'analyser les niveaux de hANG issus des extractions nucléaires et cytoplasmiques par immunobuvardage de type Western à différents points temporels. Nous proposons également d'utiliser la technique de marquage fluorescent de la protéine hANG et l'imagerie de cellules vivantes pour détecter en temps réel la translocation et l'accumulation de hANG. Bien que la cause exacte de cette accumulation nucléaire accrue de hANG en présence de 5P reste à élucider, nos résultats démontrent de manière robuste que ce composé a un impact significatif sur la localisation subcellulaire de cette protéine, avec une accumulation marquée dans le noyau après 1h de traitement.

En revanche, le Neo cible la poche catalytique pour empêcher la translocation nucléaire de hANG et inhiber l'endocytose générale de hANG. Ces résultats nous ont fourni des outils moléculaires pour moduler la relocalisation de hANG dans les cellules HeLa en utilisant les composés 5P et Neo (c'est-à-dire pour renforcer ou inhiber l'accumulation de hANG dans le noyau, respectivement). Malgré leurs effets opposés en renforçant (5P) ou en inhibant (Neo) l'accumulation de hANG dans le noyau, les deux composés ont été signalés pour prévenir la viabilité ou prolifération cellulaire induite par hANG (nos résultats et Hu, 1998). Cela soulève la question à savoir si la relocalisation de hANG dans les cellules pourrait impliquer des voies de signalisation cellulaire spécifiques, un aspect à considérer puisque la relocalisation de hANG a été confirmée dans plusieurs états pathologiques (Thiyagarajan et al., 2012; Van Es et al., 2011; D. Wu et al., 2007).



**Figure 3.10 Analyse par immunobuvardage de type Western des niveaux de translocation nucléaire de hANG exogène dans les cellules HeLa dans différentes conditions de traitement.** Les échantillons correspondent à l'extraction cytoplasmique (gauche) et nucléaire (droite) du véhicule (non traité) ; traité avec hANG, hANG + 5P, hANG + 5F et hANG + Neo. 5P, 5F et Neo ont été utilisés à la concentration de 100  $\mu$ M ; hANG a été utilisée à 100 nM. Le véhicule (contrôle négatif) est composé de cellules non traitées par hANG ou des composés, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, afin d'évaluer le bruit de fond causé par hANG endogène. La lamine A/C a été utilisée comme contrôle de charge pour l'extraction de protéines nucléaires, tandis que la  $\beta$ -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge pour l'extraction de protéines cytoplasmiques. La concentration de protéines a été mesurée à l'aide d'un dosage BCA. La concentration de protéines chargée était de 25-50  $\mu$ g/puits. L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (ns : non significatif, \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes

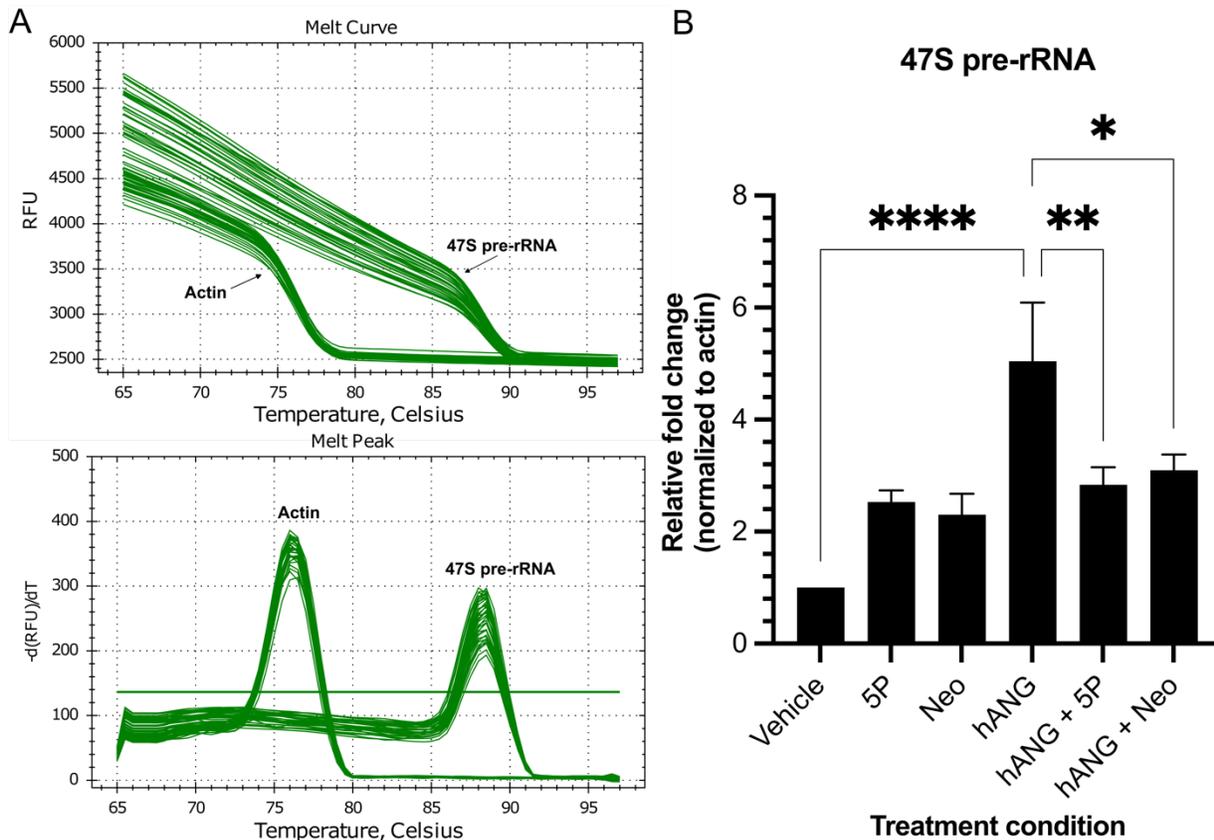
### **3.3.3 Effet d'une modulation de l'accumulation nucléaire de hANG sur la transcription du pré-ARNr 47S dans les cellules HeLa**

Plusieurs études ont souligné qu'après s'être transloquée dans le noyau, hANG favorise la prolifération cellulaire, la croissance et l'angiogenèse en stimulant le processus de transcription du pré-ARNr 47S (Kishimoto et al., 2005; Monti et al., 2009; Moroianu & Riordan, 1994b; Z. ping Xu et al., 2003). Dans les expériences suivantes, nous avons utilisé 5P et Neo comme outils pour la modulation de la translocation et l'accumulation nucléaire de hANG au sein des cellules HeLa. Nous étions curieux de savoir si nous pouvions observer une expression différentielle du pré-ARNr 47S dans ces deux états de relocalisation nucléaire de hANG. Bien que l'évaluation de l'effet du composé 5F sur la transcription du pré-ARNr 47S puisse également avoir une signification, étant donné que 5F semble avoir un impact sur l'accumulation nucléaire différent de 5P et qui s'apparente davantage à celui de Neo, nous avons choisi de nous concentrer dans un premier temps sur les conditions opposées. En effet, l'effet de Neo sur la translocation de ANG ayant déjà été décrit précédemment, cela justifiait le choix de cette molécule plutôt que 5F pour cette évaluation. Nous souhaitions ainsi explorer les impacts contrastés de ces différents modulateurs de la translocation et l'accumulation nucléaire sur la transcription du pré-ARNr 47S. Nous avons réalisé des mesures en triplicata d'expériences de RT-qPCR avec deux répliques biologiques en utilisant un instrument de PCR en temps réel et une normalisation (Section 2.4.6). Ces expériences nous ont permis d'observer les effets contrastés de la relocalisation nucléaire de hANG, qui est renforcée par 5P et inhibée par Neo.

Comme précédemment rapporté, le pré-ARNr 47S, souvent désigné comme un précurseur de l'ARN ribosomique (ARNr), est rapidement transformé en ARNr matures tels que l'ARNr 28S, l'ARNr 5.8S ou l'ARNr 18S après la transcription, remplissant ainsi leurs fonctions de traduction des ribosomes. Ce processus se déroule rapidement en quelques minutes (Popov et al., 2013). Par conséquent, nous avons quantifié le pré-ARNr 47S au moment précis où nous avons observé le repositionnement nucléaire le plus prononcé de hANG, c'est-à-dire après 1 heure de traitement. À cette fin, nous avons utilisé des amorces conçues par Li et al., 2018. Lors de l'examen à l'aide des outils NCBI Blast, nous avons confirmé que la région d'amplification englobait 189 nucléotides situés dans le site de clivage du pré-ARNr. Notamment, cette région d'amplification présentait une forte teneur en GC dépassant 80 %, nécessitant des conditions d'amplification rigoureuses. Suivant les recommandations de Jensen et al., 2010, nous avons optimisé la réaction en la complétant avec 5 % de DMSO. De manière surprenante, la température de montée optimisée a

également contribué de manière significative au succès de l'expérience (voir section Matériel et Méthodes pour plus de détails).

Une découverte plutôt surprenante dans notre travail avec les différents dispositifs de qPCR était que lorsque nous avons configuré des paramètres similaires sur deux systèmes, le Quantstudio™ 3 d'Applied Biosystems et le système de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 Touch, les échantillons fonctionnaient uniquement sur le dispositif Bio-Rad CFX96 Touch en temps réel. Cela pourrait être dû aux différents cycles de température de chauffage/refroidissement utilisés entre les appareils. Par conséquent, les facteurs de taux de chauffage/refroidissement doivent être surveillés de près et avec précision pour les échantillons présentant des taux de GC très élevés (>80 %). Les résultats montrent que nous avons obtenu avec succès un produit d'amplification distinct pour chaque paire d'amorces (pour l'actine et le pré-ARNr 47S), indiquant la haute spécificité du processus d'amplification (Figure 3.11 A).



**Figure 3.11** La modulation de l'accumulation nucléaire de hANG par les composés (5P, Neo) affecte les niveaux de transcription de pré-ARNr 47S, mesurés par RT-qPCR. Les cellules HeLa ont été traitées individuellement avec les composés 5P, Neo ou hANG, ainsi qu'avec hANG + composés (5P ou Neo) pendant 1h. A. Profil de courbe de fusion de la réaction de RT-qPCR. B. Différents niveaux de pré-ARNr 47S réalisés sur un système XF96 Bio-Rad Real-

Time PCR sous la modulation de l'accumulation nucléaire avec ou sans composés. 5P et Neo ont été utilisés à la concentration de 100  $\mu$ M ; hANG a été utilisé à 100 nM. L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Le véhicule (contrôle négatif) correspond à des cellules non traitées par hANG ou des composés, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, pour évaluer le bruit de fond de l'expérience. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM de deux répétitions biologiques, comprenant trois expériences indépendantes chacune.

Une fois à l'intérieur du noyau, hANG stimule la transcription de l'ARN ribosomique (ARNr) grâce à son activité ribonucléolytique (Monti et al., 2009, Sheng et al., 2014, Z. ping Xu et al., 2002). Nos résultats expérimentaux ont montré, après 1 heure de traitement avec hANG, une augmentation significative 5 fois plus élevée du pré-ARNr 47S par rapport à l'échantillon non traité (véhicule) (Figure 3.11 B). Il n'est pas surprenant que pour les échantillons traités avec hANG + Neo, où hANG est empêché de se transloquer dans le noyau par Neo, les niveaux de pré-ARNr 47S ont diminué. Cela est conforme à l'hypothèse selon laquelle hANG doit se transloquer dans le noyau pour favoriser l'expression du pré-ARNr 47S. Cependant, à notre grande surprise, l'augmentation de deux fois des niveaux de hANG dans le noyau cellulaire induite par 5P a entraîné une diminution des niveaux de pré-ARNr 47S dans les échantillons co-traités avec hANG et 5P. Plus surprenant encore, les niveaux de pré-ARNr 47S ont diminué dans la même mesure que dans les échantillons où les niveaux de hANG dans le noyau cellulaire étaient réduits de moitié par Neo.

Associés à nos résultats de viabilité cellulaire (section 3.3.1), et malgré le fait que 5P facilite l'accumulation nucléaire de hANG, il est possible que ce composé inhibe la capacité de hANG à stimuler la survie cellulaire par une interaction avec la protéine, compromettant les voies de signalisation nécessaires à hANG pour promouvoir la survie et/ou la prolifération cellulaire. Cependant, 5P peut toujours améliorer la translocation de hANG vers le noyau. Dans des conditions normales, hANG dans le noyau peut activer des gènes ou des voies essentielles à la croissance cellulaire. Cependant, en présence de 5P, ces interactions ou signaux peuvent être perturbés, empêchant hANG de stimuler la prolifération cellulaire. Des études antérieures ont souvent suggéré que le blocage de la translocation nucléaire peut inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogenèse induites par hANG (Hoang & Raines, 2017; S. Li & Hu, 2012; Tsuji et al., 2005; Z. ping Xu et al., 2002). Nous soulignons que l'inhibition des fonctions prolifératives de hANG n'a pas nécessairement besoin de passer par le blocage de son entrée dans le noyau cellulaire, mais pourrait éventuellement utiliser des modulateurs allostériques pour modifier des fonctions spécifiques, comme suggéré par nos résultats de RMN (Section 3.2.2).

D'un autre point de vue, en plus de son rôle dans la stimulation de la transcription du pré-ARNr 47S, hANG a également été identifiée comme pouvant participer directement au processus de maturation du pré-ARNr en ARNr matures, en agissant en tant qu'endonucléase (Lyons et al., 2017; Monti et al., 2009). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que le composé 5P puisse interférer avec ce processus, en stimulant le clivage du pré-ARNr 47S par l'intermédiaire de hANG, ce qui pourrait expliquer la diminution du niveau de pré-ARNr 47S observée dans nos expériences où hANG s'accumule davantage dans le noyau. Cependant, la limite de notre étude est que nous n'avons pas mené d'expériences pour quantifier les produits matures dérivés du pré-ARNr 47S, ce qui nous empêche de tirer des conclusions définitives sur cette hypothèse. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour élucider plus en détail les effets potentiels du composé 5P sur les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes impliquant hANG.

### **3.3.4 La modulation de l'accumulation nucléaire de hANG impacte-t-elle les voies de survie cellulaire ?**

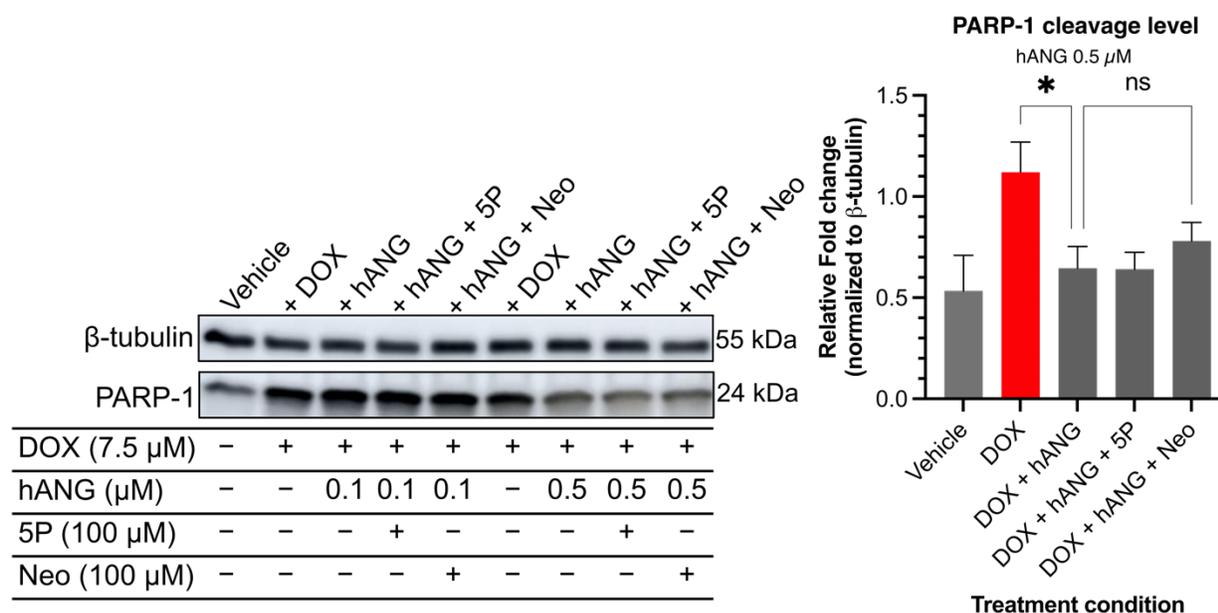
Après avoir élucidé l'impact de l'accumulation nucléaire de hANG sur la viabilité et prolifération cellulaire, nous avons évalué son rôle dans la pro-survie par test d'apoptose cellulaire. Cette fonction particulière de hANG revêt une importance significative dans le traitement du cancer en ciblant les voies médiées par hANG, car il a été démontré qu'il favorise la survie cellulaire dans la radiothérapie pour les types de cancers agressifs (Guo et al., 2021), en plus de réduire la sensibilité des cellules cancéreuses aux médicaments thérapeutiques (Y. N. Wang et al., 2018). Nous avons également étudié la relation entre hANG et p53. p53 est un suppresseur de tumeurs qui joue un rôle crucial dans la détection des dommages de l'ADN et l'activation des gènes en aval impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose (Soussi, 2000). Il est important de noter que hANG interagit avec p53 dans le noyau, inhibant ainsi l'apoptose médiée par p53 (Sadagopan et al., 2012).

Notre étude a révélé que la présence de 5P a augmenté l'accumulation nucléaire de hANG, tandis que Neo l'a considérablement réduite. Gardant cela à l'esprit, notre objectif était de mieux comprendre comment hANG contribue à la survie cellulaire en contrecarrant l'apoptose par l'accumulation nucléaire. Nous avons formulé l'hypothèse que la modulation de l'accumulation de hANG avec des composés spécifiques (5P, Neo) pourrait potentiellement affecter sa capacité à protéger les cellules de l'apoptose, plus précisément grâce à la médiation par p53. Selon la littérature, la doxorubicin (DOX) est un puissant médicament de chimiothérapie qui inhibe la topoisomérase II et induit des dommages à l'ADN, entraînant l'apoptose. Ce médicament génère

des espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant des dommages oxydatifs dans les cardiomyocytes et une apoptose ultérieure par la voie de p53 (S. Wang et al., 2004). Par conséquent, nous avons utilisé le DOX comme facteur d'apoptose pour cette expérience.

Nous avons d'abord traité les cellules HeLa avec hANG et des composés dans un milieu sans sérum pour examiner l'effet de la privation de nutriments sur la formation du fragment PARP-1 de 24 kDa sur une période de 0 à 48 heures. Nous avons observé une augmentation de la présence du fragment PARP-1 de 24 kDa avec le temps dans des conditions de privation de nutriments. Cependant, ce phénomène a été inhibé dans les 24 premières heures après le traitement avec hANG. Après 24 heures, la présence du fragment PARP-1 de 24 kDa est devenue inconstante entre les échantillons traités par hANG et ceux non traités, rendant difficile son évaluation (Figure S5 en annexe). Il est important de noter qu'il existe divers phénotypes d'apoptose, et la privation de nutriments peut renforcer la capacité d'autophagie.

À travers l'expérience, les cellules HeLa ont été maintenues dans un milieu sans sérum, nécessitant de prendre en compte les effets de la privation de sérum sur le niveau du fragment PARP-1 de 24 kDa. Nous avons observé une augmentation significative du niveau du fragment PARP-1 de 24 kDa après plus de 4 heures de privation de sérum. Pour minimiser l'influence de la privation de sérum sur le clivage de PARP-1, nous avons limité le temps d'exposition au DOX à un maximum de 4 heures. Il est bien établi que la toxicité d'une substance est influencée par des facteurs tels que la concentration et la durée d'exposition. Par conséquent, nous avons utilisé le réactif Cell-titer blue (Omega) pour évaluer les effets cytotoxiques du DOX après 4 heures et déterminé une concentration appropriée pour l'expérience. Ensuite, nous avons analysé le clivage de PARP-1 à différentes concentrations de DOX après 4 heures de traitement pour sélectionner la concentration appropriée de DOX. Enfin, le DOX a été utilisé à 7,5  $\mu$ M avec un temps d'exposition de 4 heures pour le test (Figure S6 en annexe).



**Figure 3.12 Modulation de l'accumulation nucléaire de hANG par 5P et Neo et son impact sur les voies de survie cellulaire mesurées par le clivage de PARP-1 en un fragment de 24 kDa par immunobuvardage de type Western.** Les échantillons ont été traités avec des composés séparés (5P + DOX ou Neo + DOX seulement), hANG + DOX, hANG + 5P + DOX et hANG + Neo + DOX. 5P et Neo ont été utilisés à la concentration de 100  $\mu$ M ; hANG a été utilisée à 100 nM ; DOX a été utilisé à 7,5  $\mu$ M dans le test. Le véhicule (contrôle négatif) correspond à des cellules non traitées par DOX, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la réponse apoptotique induite par DOX. Les résultats soulignent l'impact de la translocation nucléaire de hANG (augmentée par 5P et inhibée par Neo), influençant sa fonction protectrice contre l'apoptose induite par DOX, suggérant que cette fonction peut se produire indépendamment de sa translocation nucléaire. L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (ns : non significatif, \* $p < 0,05$ ). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes.

Les cellules traitées individuellement avec les composés (5P, Neo) ou co-traitées avec DOX et les composés ont montré que les composés n'avaient pas d'impact significatif sur le niveau de clivage de la PARP-1 de 24 kDa induit par le DOX dans les cellules (Figure S7). L'analyse des niveaux de clivage de PARP-1 (Figure 3.12) a révélé une augmentation significative du fragment PARP-1 de 24 kDa après 4 heures de traitement au DOX. À une concentration de 0,1  $\mu$ M de hANG, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans le niveau du fragment PARP-1 de 24 kDa, indépendamment de l'accumulation nucléaire de hANG améliorée/inhibée en présence des composés 5P et Neo, respectivement. Cependant, dans les cellules traitées avec hANG à une concentration de 0,5  $\mu$ M, le niveau du fragment PARP-1 de 24 kDa a diminué de manière significative. Notamment, dans les échantillons traités simultanément avec 5P ou Neo et hANG (correspondant à l'état de l'accumulation nucléaire de hANG favorisé ou inhibé), nous

avons observé une diminution significative du niveau du fragment PARP-1 de 24 kDa, apparemment indépendamment de l'accumulation nucléaire de hANG.

La faiblesse de notre étude réside dans le manque de focalisation sur l'analyse du niveau de p53 dans les cellules dans différentes conditions de traitement. Cependant, selon les résultats de recherches antérieures, bien que les cellules HeLa possèdent un gène p53 de type sauvage, il est apparu qu'elles présentent des effets fonctionnels similaires à un gène p53 muté. Cette observation est due à la dégradation rapide de p53 par la voie du protéasome induite par la protéine E6 du VPH à haut risque (Johnson et al., 2002; Kralj et al., 2003). Ce constat a remis en question notre hypothèse initiale selon laquelle la doxorubicine pourrait déclencher la voie de l'apoptose dans les cellules HeLa via p53. Ainsi, il semble que de déterminer le niveau d'expression de p53 ne soit pas nécessaire, mais qu'il pourrait être beaucoup plus remarquable d'explorer le mécanisme réel de la cytotoxicité induite par la DOX dans les cellules HeLa et la façon dont hANG protège ces cellules contre l'apoptose programmée par la DOX. Plus précisément, nous proposons d'analyser l'expression des gènes anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques à l'aide de la qPCR dans les cellules HeLa, en traitant les cellules avec hANG (+ composés, 5P, Neo) et DOX. Envisager un modèle d'étude alternatif avec une fonction p53 intacte pourrait également être une approche autre pour évaluer la capacité protectrice de hANG contre l'apoptose induite par la DOX.

### ***3.3.5 L'impact de la relocalisation subcellulaire de hANG par les composés (5P et Neo) modulant le clivage de l'ARNt sous stress oxydatif***

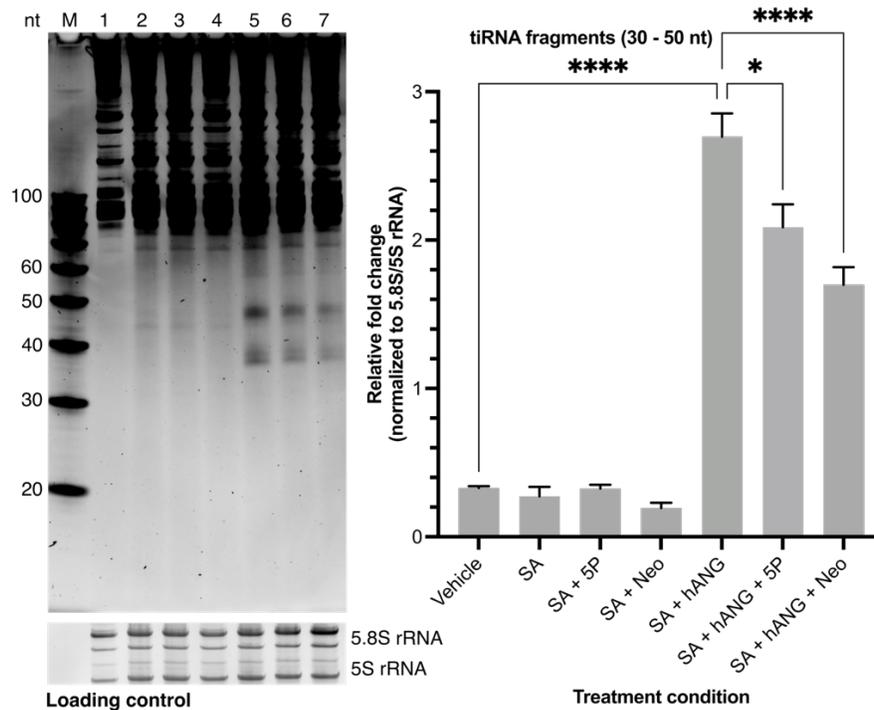
Le clivage de l'ARNt dans des conditions de stress est une autre fonction importante de hANG qui aide les cellules à répondre au stress (Emara et al., 2010; S. Li & Hu, 2012; Lyons et al., 2017; Sheng & Xu, 2016). Ce processus se produit lorsque les cellules sont soumises à des conditions défavorables telles que le stress mécanique, le manque de nutriments et le stress oxydatif. Pendant la réponse, il a été montré que hANG peut se détacher de l'interaction avec RI dans le cytoplasme pour cliver l'ARNt, inhibant la traduction cellulaire globale et maintenant l'énergie cellulaire (Emara et al., 2010). L'ARNt dérivé du stress-induit (ARNti) contribue à la répression de la traduction lorsque les cellules sont soumises à un stress adaptatif. Le produit clivé de ARNti pourrait déclencher la formation de granules de stress indépendamment de la voie eIF2 $\alpha$  (Lyons et al., 2016). De plus, l'activité ribonucléase de hANG joue un rôle crucial dans la génération de ARNti et l'activation de mécanismes neuroprotecteurs (Emara et al., 2010; Subramanian et al., 2008). Pour clarifier l'impact de la localisation de hANG sur son activité de clivage de ARNti dans

les cellules, nous avons réalisé des expériences examinant sa capacité à cliver l'ARNt dans des conditions de stress. Nous avons utilisé l'arsénite de sodium (SA) comme facteur de stress cellulaire pour induire le stress cellulaire par le mécanisme du stress oxydatif, couramment utilisé pour induire le stress dans les cellules de mammifères (S. Li et al., 2018; Yamasaki et al., 2009). Il a été démontré que hANG favorise le clivage de l'ARNt en ARNti sous stress cellulaire par SA (S. Li et al., 2018; Yamasaki et al., 2009). Au cours de ce processus, l'ARNt est clivé en fragments de ARNti d'environ 30 à 50 nt de taille (Yamasaki et al., 2009). On pense que ces fragments de ARNti participent au contrôle de la transcription des gènes codant pour les protéines en ciblant des complexes de silençage épigénétique (Tao et al., 2020). Nos résultats ont été analysés sur un gel TBE/8M urée, 15% d'acrylamide, coloré au SYBR Gold, et scanné à l'aide du système GelDoc. Les ARNr 5.8S/5S (~150/120 nt) ont été utilisés comme témoins de chargement pour normaliser les données à l'aide du logiciel Image Lab. L'expérience a été réalisée en triplicata et les résultats sont présentés dans la Figure 3.13.

L'analyse des fragments de ARNti a révélé que la présence de hANG à une concentration de 100 nM a augmenté le clivage de l'ARNt dans le cytoplasme après une heure d'exposition à 500  $\mu$ M de stress cellulaire induit par SA (Figure 3.13). Ce résultat est cohérent avec les études de Yamasaki et al., 2009, qui ont démontré que hANG joue un rôle dans la réponse cellulaire au stress induit par SA en clivant l'ARNt dans le cytoplasme. Nos résultats ont indiqué que le traitement avec soit 5P ou Neo seul n'a pas affecté de manière significative les niveaux de clivage de l'ARNt (en raison de l'hANG endogène) dans des conditions de stress par SA (Figure 3.13). Cependant, les cellules traitées avec hANG + 5P ont montré une réduction significative des niveaux de ARNti (30-50 nt) par rapport aux cellules traitées avec hANG seule après une heure d'exposition au stress cellulaire induit par SA. Ce résultat est intrigant car, dans une expérience précédente, nous avons observé qu'après une heure de traitement, les niveaux d'accumulation cytoplasmique de hANG étaient égaux dans les cellules traitées avec hANG seule et les cellules traitées avec hANG + 5P (Figure 3.10). Cependant, les niveaux de ARNti étaient différents, alors que cette activité de hANG se produit dans le cytoplasme.

Pour expliquer les mécanismes derrière cette observation, nous proposons deux hypothèses : (1) 5P peut se lier au site actif de hANG, entraînant une réduction du clivage de l'ARNt induit par hANG dans le cytoplasme dans des conditions de stress. Cependant, cette hypothèse a été rejetée sur la base d'expériences de RMN, qui ont montré que 5P ne cible pas la poche catalytique de hANG. De plus, dans un test indépendant sur gel d'ARN *in vitro*, 5P n'a pas inhibé l'activité de clivage de l'ARNt de hANG (Figure S8). (2) La relocalisation de hANG dans la cellule semble

affecter son comportement en réponse au stress cellulaire. Il est plausible qu'une accumulation accrue de hANG vers le noyau puisse augmenter l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la réponse au stress oxydatif, entraînant une régulation à la baisse de la réponse au stress oxydatif dans le cytoplasme par le clivage de l'ARNt médié par hANG. Des études antérieures ont montré que hANG peut induire la transcription d'ARNm de gènes spécifiques (H. H. Lee et al., 2019b) ou de gènes anti-apoptotiques (Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011). Par conséquent, lorsque hANG subit une accumulation accrue dans le noyau, il est possible que l'expression de gènes anti-stress oxydatif soit induite.



**Figure 3.13 Modulation du clivage des ARNt sous stress oxydatif par la relocalisation subcellulaire de hANG par 5P et Neo.** Les fragments d'ARNt ont été analysés à partir d'ARN total extrait de cellules HeLa sur un gel d'ARN. Les échantillons comprenaient : (1) Le véhicule (contrôle négatif) correspond à des cellules non traitées par SA, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la réponse de stress cellulaire induite par SA; les cellules traitées avec (2) SA ; (3) SA + 5P ; (4) SA + Neo ; (5) SA + hANG ; (6) SA + 5P + hANG ; ou (7) SA + Neo + hANG. 5P et Neo ont été utilisés à la concentration de 100  $\mu$ M ; hANG a été utilisée à 100 nM ; SA a été utilisé à 500  $\mu$ M dans le test. L'échelle d'ARN (100 pb, Biolabs) a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire. L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ ). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

Contrairement à ces résultats, les cellules traitées avec hANG + Neo ont montré une réduction significative du clivage de l'ARNt dans des conditions de stress oxydatif. Cela peut être attribué au fait qu'après une heure de traitement avec hANG + Neo, les niveaux d'accumulation de hANG dans le cytoplasme et le noyau étaient réduits (Section 3.3.2), entraînant une diminution de la fonction de clivage de l'ARNt de hANG dans le cytoplasme. Cette découverte est étayée par les études de (Panda et al., 2022), qui ont montré que Neo pouvait inhiber l'activité de clivage de l'ARN de hANG *in vitro*. Pour élucider si l'accumulation accrue de hANG par 5P module sa fonction dans la réponse au stress cellulaire, nous proposons de mener des expériences pour analyser les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la régulation du stress cellulaire. Cette analyse fournira des informations précieuses sur l'impact potentiel de la modulation de la localisation subcellulaire de hANG sur son rôle fonctionnel dans les mécanismes de réponse au stress cellulaire.

## 4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Ce projet de recherche a réussi à identifier un nouveau fragment d'acide phénylpyridine-2-carboxylique (5P) qui se lie à hANG, démontrant la capacité de moduler la localisation subcellulaire de hANG en améliorant son accumulation nucléaire dans les cellules HeLa. De plus, l'activité ribonucléolytique *in vitro* de hANG n'a pas été abolie en présence de des fragments 5P et 5F (Figure S8). Les expériences de titrage par résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC n'ont pas révélé de changements significatifs des déplacements chimiques induits par 5P pour les résidus catalytiques H13, H114 et K40. Néanmoins, la réponse cellulaire de hANG peut être modulée en présence de 5P, suggérant l'existence d'un mécanisme allostérique potentiel et/ou d'une perturbation des interactions protéine-protéine entre hANG et d'autres partenaires moléculaires potentiels. De plus, l'antibiotique aminoglycoside Neo, initialement utilisé comme contrôle pour l'inhibition de la translocation nucléaire de hANG, s'est avéré se lier directement à hANG, bien qu'avec une faible affinité de l'ordre du millimolaire. Les expériences de titrage RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ont confirmé que l'un des sites de liaison potentiels de Neo cible la poche catalytique de hANG. Il a été confirmé que Neo inhibe l'accumulation nucléaire de hANG et bloque son endocytose dans les cellules HeLa. Dans cette étude, nous avons également tenté de résoudre la structure cristalline aux rayons X d'un complexe moléculaire entre Neo et hANG. Cependant, nous n'avons réussi à obtenir que des cristaux de hANG libre, malgré l'utilisation de rapports de saturation hANG:Neo allant jusqu'à 1:10 et 1:20, avec des concentrations de hANG de 5 mg/mL et 10 mg/mL. Ce résultat est probablement attribué à la relativement faible affinité du complexe protéine-ligand hANG:Neo (mM).

En termes de modulation de l'accumulation subcellulaire, cette étude suggère que le domaine catalytique de hANG peut jouer un rôle dans son internalisation et son accumulation nucléaire. Ceci est indiqué par l'action directe de Neo sur le domaine catalytique de hANG réduisant à la fois l'endocytose et l'accumulation nucléaire de hANG (cette étude). De plus, bien que 5P semble augmenter l'accumulation de hANG dans le noyau, nous ne disposons pas de données sur la cinétique d'accumulation et la demi-vie de hANG. Cela nous empêche d'exclure la possibilité que 5P stabilise simplement hANG dans le noyau. Pour clarifier davantage les mécanismes de modulation de l'accumulation subcellulaire de hANG de cette étude, nous proposons d'utiliser des techniques de marquage fluorescent et d'imagerie en temps réel afin d'avoir un portrait de la localisation en fonction du temps. Aussi, il serait intéressant de déterminer le temps de demi-vie de hANG, en présence ou non de composés (5P, Neo). Nous avons observé que 5P et Neo ont

des effets opposés sur l'accumulation nucléaire de hANG (favorisant/inhibant) alors que les deux composés 5P et Neo réduisent la survie et/ou la prolifération cellulaire (cette étude; Hu, 1998; Ibaragi, Yoshioka, Kishikawa, et al., 2009; Ibaragi, Yoshioka, Li, et al., 2009), ce qui soulève des questions sur les voies de signalisation impliquées. Les études sur les voies de signalisation modifiées par la présence de composés (5P, Neo) et leur impact sur la localisation nucléaire de hANG, ainsi que sur son activité de promotion de la survie cellulaire, constitueront une autre approche essentielle pour mieux comprendre ce mécanisme complexe.

L'analyse de l'expression du pré-ARNr 47S a montré que hANG stimule la transcription de l'ARN ribosomal, des résultats cohérents avec les études précédemment publiées (Ibaragi, Yoshioka, Kishikawa, et al., 2009; Sheng et al., 2014; Z. ping Xu et al., 2002). De plus, cette stimulation est diminuée lorsque la translocation nucléaire de hANG est bloquée par Neo, mais elle n'est pas exacerbée par 5P, malgré l'accumulation accrue de hANG dans le noyau avec ce composé. L'hypothèse selon laquelle 5P favorise une maturation rapide du pré-ARNr 47S dans le noyau doit être clarifiée. Des expériences visant à identifier et quantifier les produits matures dérivés du pré-ARNr 47S aideraient à clarifier le rôle de la modulation de l'accumulation subcellulaire de hANG sur la stimulation de la transcription de l'ARNr et de la prolifération cellulaire.

Dans les expériences d'induction de l'apoptose par la DOX, hANG semble capable de protéger les cellules HeLa contre l'apoptose, de manière indépendante de son interaction connue avec p53 (Sadagopan et al., 2012). L'utilisation d'un modèle cellulaire avec une fonction p53 intacte est une approche qui pourrait devoir être envisagée pour évaluer de manière plus complète ce rôle protecteur de hANG sur la survie cellulaire. Nos résultats indiquent que cette fonction de protection cellulaire de hANG ne dépend pas de son accumulation nucléaire (en présence de 5P). L'analyse de l'expression des gènes anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques pourrait aider à comprendre le mécanisme de protection cellulaire de hANG.

Dans l'expérience sur le stress cellulaire, nos analyses ont montré que hANG augmente le clivage des ARNti dans le cytoplasme en réponse au stress causé par SA dans les cellules HeLa. En effet, le fait que hANG favorise le clivage des ARNti dans le cytoplasme dans des conditions de stress a déjà été démontré, suggérant sa fonction cytoprotectrice (Emara et al., 2010; S. Li et al., 2018; Yamasaki et al., 2009). Or, l'accumulation subcellulaire de hANG en présence du composé 5P réduit cette fonction de clivage de l'ARNt par hANG dans les cellules HeLa (cette étude). Cela suggère que 5P peut modifier le comportement de hANG en réponse au stress cellulaire, bien que le mécanisme reste à élucider. Des expériences d'analyse qPCR sur l'expression des gènes liés à la réponse au stress oxydatif, ainsi que l'évaluation de l'accumulation de hANG dans

différentes conditions, permettraient de mieux comprendre l'impact de 5P sur hANG et le rôle de hANG dans la réponse au stress cellulaire.

En effet, nos expériences se sont pour le moment limitées à un seul modèle cellulaire, les cellules HeLa. Bien que nous ayons fourni des justifications pour le choix de ce modèle et que les cellules HeLa soient une lignée cellulaire cancéreuse largement utilisée dans la recherche en biologie cellulaire et moléculaire humaine (Frattini et al., 2015; Landry et al., 2013), de nombreuses études ont montré que ces cellules présentent des caractéristiques différentes des cellules non malignes. Plus spécifiquement, une surexpression de gènes a été notée chez les cellules HeLa (Landry et al., 2013). Ainsi, ces cellules ont une prolifération incontrôlée avec des gènes hautement exprimés liés à la prolifération, à la transcription et à la réparation de l'ADN (Mittelman & Wilson, 2013). De plus, leurs voies de signalisation cellulaire, de régulation et métaboliques ainsi que leurs réseaux de régulation diffèrent des cellules non malignes (Higareda-Almaraz et al., 2013; Landry et al., 2013). Par exemple, une expression transcriptionnelle modifiée des effecteurs directs de p53 (Higareda-Almaraz et al., 2013) peut modifier les comportements des cellules HeLa liés à la voie de signalisation de p53. Ces facteurs peuvent influencer le comportement cellulaire lors de l'étude des voies de signalisation impliquant hANG. Néanmoins, l'utilisation des cellules HeLa constitue une étape initiale qui nous permet d'avoir un point de comparaison objectif avec les études antérieures sur hANG dans ce modèle. Sur la base de ces résultats préliminaires, nous pourrions orienter la conception d'expériences sur d'autres lignées cellulaires, afin d'obtenir une vision plus complète des mécanismes de régulation des fonctions de hANG en réponse à son accumulation cellulaire. Ainsi, bien que les cellules HeLa aient leurs limites, elles nous ont permis d'établir un point de départ solide pour notre étude. Nous envisageons maintenant d'étendre nos analyses à d'autres modèles cellulaires, afin d'enrichir notre compréhension du rôle de hANG dans des contextes physiologiques plus représentatifs.

En conclusion, cette étude a permis d'approfondir notre compréhension des mécanismes d'action de hANG, une protéine participant à de multiples processus biologiques. En particulier, des données supplémentaires s'ajoutent à notre compréhension de l'impact de la localisation intracellulaire sur des mécanismes moléculaires spécifiques dans lesquels hANG joue un rôle important. Enfin, cette étude ouvre le pas à la découverte d'autres ligands allostériques de hANG (ne ciblant pas le site catalytique) et à des études futures sur les effets de modulations des activités biologiques par de tels ligand de hANG.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

---

- Acharya, K. R., Shapiro, R., Allen, S. C., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2915>
- Acharya, K. R., Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1995). Crystal structure of bovine angiogenin at 1.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2949>
- Akiyama, Y., Lyons, S. M., Fay, M. M., Tomioka, Y., Abe, T., Anderson, P. J., & Ivanov, P. (2022). Selective Cleavage at CCA Ends and Anticodon Loops of tRNAs by Stress-Induced RNases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.791094>
- Alibolandi, M., & Mirzahoseini, H. (2011). Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. In *Biochemistry Research International*. <https://doi.org/10.1155/2011/631607>
- Aparicio-Erriu, I. M., & Prehn, J. H. M. (2012). Molecular mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis: The role of angiogenin, a secreted rnaase. *Frontiers in Neuroscience*, NOV. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00167>
- Ayotte, Y., Bilodeau, F., Descoteaux, A., & LaPlante, S. R. (2018). Fragment-Based Phenotypic Lead Discovery: Cell-Based Assay to Target Leishmaniasis. *ChemMedChem*, 13(14). <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800161>
- Badet, J., Soncin, F., N'Guyen, T., & Barritault, D. (1990). In vivo and in vitro studies of angiogenin-a potent angiogenic factor. In *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis* (Vol. 1, Issue 6).
- Bai, R., Sun, D., Chen, M., Shi, X., Luo, L., Yao, Z., Liu, Y., Ge, X., Gao, X., Hu, G., Zhou, W., Sheng, J., & Xu, Z. (2020). Myeloid cells protect intestinal epithelial barrier integrity through the angiogenin/plexin-B2 axis. *The EMBO Journal*, 39(13). <https://doi.org/10.15252/embj.2019103325>
- Beintema, J. J., & van der Laan, J. M. (1986). Comparison of the structure of turtle pancreatic ribonuclease with those of mammalian ribonucleases. *FEBS Letters*, 194(2). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80113-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80113-2)

- Bernard, D. N., Narayanan, C., Hempel, T., Bafna, K., Bhojane, P. P., Létourneau, M., Howell, E. E., Agarwal, P. K., & Doucet, N. (2023). Conformational exchange divergence along the evolutionary pathway of eosinophil-associated ribonucleases. *Structure*, 31(3). <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.12.011>
- Boehm, E. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2016). The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. In *Enzymes* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>
- Bradshaw, W. J., Rehman, S., Pham, T. T. K., Thiyagarajan, N., Lee, R. L., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2017). Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41996>
- Chatzileontiadou, D. S. M., Samiotaki, M., Alexopoulou, A. N., Cotsiki, M., Panayotou, G., Stamatiadi, M., Balatsos, N. A. A., Leonidas, D. D., & Kontou, M. (2017). Proteomic analysis of human angiogenin interactions reveals cytoplasmic PCNA as a putative binding partner. *Journal of Proteome Research*, 16(10). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00335>
- Chen, Z., Qi, M., Shen, B., Luo, G., Wu, Y., Li, J., Lu, Z., Zheng, Z., Dai, Q., & Wang, H. (2019). Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gky1250>
- Cho, S., Beintema, J. J., & Zhang, J. (2005). The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 85(2). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.10.008>
- Couchman, J. R. (2003). Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 4, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrm1257>
- Crivello, M., O'Riordan, S. L., Woods, I., Cannon, S., Halang, L., Coughlan, K. S., Hogg, M. C., Lewandowski, S. A., & Prehn, J. H. M. (2018). Pleiotropic activity of systemically delivered angiogenin in the SOD1G93A mouse model. *Neuropharmacology*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.022>
- Cruz, J. W., & Woychik, N. A. (2016). tRNAs taking charge. In *Pathogens and disease* (Vol. 74, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv117>

- Curran, T. P., Shapiro, R., & Riordan, J. F. (1993). Alteration of the Enzymatic Specificity of Human Angiogenin by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 32(9). <https://doi.org/10.1021/bi00060a023>
- Donà, F., & Houseley, J. (2014). Unexpected DNA loss mediated by the DNA binding activity of ribonuclease A. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115008>
- Dong, H., Weng, C., Bai, R., Sheng, J., Gao, X., Li, L., & Xu, Z. (2019). The regulatory network of miR-141 in the inhibition of angiogenesis. *Angiogenesis*, 22(2). <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9654-1>
- Dutta, S., Bandyopadhyay, C., Bottero, V., Veetil, M. V., Wilson, L., Pins, M. R., Johnson, K. E., Warshall, C., & Chandran, B. (2014). Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulate plasmin formation and cell migration. *Molecular Oncology*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.12.017>
- Dyer, K. D., & Rosenberg, H. F. (2006). The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense. In *Molecular Diversity* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s11030-006-9028-2>
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., & Goetinck, P. F. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2). <https://doi.org/10.1172/JCI10559>
- Emara, M. M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G. F., & Anderson, P. (2010). Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077560>
- Fasoli, S., Bettin, I., Montioli, R., Fagagnini, A., Peterle, D., Laurents, D. V., & Gotte, G. (2021). Dimerization of human angiogenin and of variants involved in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). <https://doi.org/10.3390/ijms221810068>
- Feoli, A., Sarno, G., Castellano, S., & Sbardella, G. (2024). DMSO-Related Effects on Ligand-Binding Properties of Lysine Methyltransferases G9a and SETD8. *ChemBioChem*, 25(4). <https://doi.org/10.1002/cbic.202300809>
- Ferguson, R., & Subramanian, V. (2018). The cellular uptake of angiogenin, an angiogenic and neurotrophic factor is through multiple pathways and largely dynamin independent. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193302>

- Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1985). Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells. *Biochemistry*, 24(20). <https://doi.org/10.1021/bi00341a030>
- Frattini, A., Fabbri, M., Valli, R., De Paoli, E., Montalbano, G., Gribaldo, L., Pasquali, F., & Maserati, E. (2015). High variability of genomic instability and gene expression profiling in different HeLa clones. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15377>
- Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., & Zheng, X. (2009). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Letters*, 583(2). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.043>
- Gagliardi, S., Davin, A., Bini, P., Sinfioriani, E., Poloni, T. E., Polito, L., Rivoiro, C., Binetti, G., Paterlini, A., Benussi, L., Ghidoni, R., Vanacore, N., & Cereda, C. (2019). A Novel Nonsense Angiogenin Mutation is Associated with Alzheimer Disease. In *Alzheimer Disease and Associated Disorders* (Vol. 33, Issue 2). <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000272>
- Gagné, D., & Doucet, N. (2013). Structural and functional importance of local and global conformational fluctuations in the RNase A superfamily. In *FEBS Journal* (Vol. 280, Issue 22). <https://doi.org/10.1111/febs.12371>
- Garnett, E. R., & Raines, R. T. (2022). Emerging biological functions of ribonuclease 1 and angiogenin. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 57, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.2004577>
- Goncalves, K. A., Silberstein, L., Li, S., Severe, N., Hu, M. G., Yang, H., Scadden, D. T., & Hu, G. (2016). Angiogenin Promotes Hematopoietic Regeneration by Dichotomously Regulating Quiescence of Stem and Progenitor Cells. *Cell*, 166(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.042>
- Goo, S. M., & Cho, S. (2013). The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty. *Genome Biology and Evolution*, 5(11). <https://doi.org/10.1093/gbe/evt161>
- Gotte, G., & Menegazzi, M. (2019). Biological Activities of Secretory RNases: Focus on Their Oligomerization to Design Antitumor Drugs. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02626>

- Gourse, R. L., Gaal, T., Bartlett, M. S., Appleman, J. A., & Ross, W. (1996). rRNA Transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 50). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.645>
- Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., & Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, 35(32). <https://doi.org/10.1021/bi9611164>
- Guo, S. S., Liang, Y. J., Liu, L. T., Chen, Q. Y., Wen, Y. F., Liu, S. L., Sun, X. S., Tang, Q. N., Li, X. Y., Mai, H. Q., & Tang, L. Q. (2021). Increased Angiogenin Expression Correlates With Radiation Resistance and Predicts Poor Survival for Patients With Nasopharyngeal Carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.627935>
- Gupta, M. N., & Uversky, V. N. (2024). Biological importance of arginine: A comprehensive review of the roles in structure, disorder, and functionality of peptides and proteins. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 257). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128646>
- Hallahan, T. W., Shapiro, R., Shapiro, D. J., & Vallee, B. L. (1992). Importance of Asparagine-61 and Asparagine-109 to the Angiogenic Activity of Human Angiogenin. *Biochemistry*, 31(34). <https://doi.org/10.1021/bi00149a036>
- Hallahan, T. W., Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1991). Dual site model for the organogenic activity of angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2222>
- Harper, J. W., & Vallee, B. L. (1989). A Covalent Angiogenin/Ribonuclease Hybrid with a Fourth Disulfide Bond Generated by Regional Mutagenesis. *Biochemistry*, 28(4). <https://doi.org/10.1021/bi00430a067>
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630). <https://doi.org/10.1038/387296a0>
- He, T., Qi, F., Jia, L., Wang, S., Song, N., Guo, L., Fu, Y., & Luo, Y. (2014). MicroRNA-542-3p inhibits tumour angiogenesis by targeting Angiopoietin-2. *Journal of Pathology*, 232(5). <https://doi.org/10.1002/path.4324>

- He, T., Qi, F., Jia, L., Wang, S., Wang, C., Song, N., Fu, Y., Li, L., & Luo, Y. (2015). Tumor cell-secreted angiogenin induces angiogenic activity of endothelial cells by suppressing miR-542-3p. *Cancer Letters*, 368(1). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.036>
- Higareda-Almaraz, J. C., Valtierra-Gutiérrez, I. A., Hernandez-Ortiz, M., Contreras, S., Hernandez, E., & Encarnacion, S. (2013). Analysis and Prediction of Pathways in HeLa Cells by Integrating Biological Levels of Organization with Systems-Biology Approaches. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065433>
- Hoang, T. T., Johnson, D. A., Raines, R. T., & Johnson, J. A. (2019). Angiogenin activates the astrocytic Nrf2/antioxidant-response element pathway and thereby protects murine neurons from oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 294(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008491>
- Hoang, T. T., & Raines, R. T. (2017). Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin. *Nucleic Acids Research*, 45(2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1192>
- Hu, G. F. (1998). Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9791>
- Hu, G. F., Chang, S. I. K., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1991). An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2227>
- Hu, G. F., & Riordan, J. F. (1993). Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(2). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2533>
- Hu, G. F., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12096>
- Hu, G. F., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2204>

- Hu, G. F., Strydom, D. J., Fett, J. W., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1993). Actin is a binding protein for angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1217>
- Hu, G. F., Xu, C. J., & Riordan, J. F. (2000). Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 76(3). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(20000301\)76:3<452::AID-JCB12>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(20000301)76:3<452::AID-JCB12>3.0.CO;2-Z)
- Ibaragi, S., Yoshioka, N., Kishikawa, H., Hu, J. K., Sadow, P. M., Li, M., & Hu, G. F. (2009). Angiogenin-stimulated rRNA transcription is essential for initiation and survival of AKT-induced prostate intraepithelial neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 7(3). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0137>
- Ibaragi, S., Yoshioka, N., Li, S., Hu, M. G., Hirukawa, S., Sadow, P. M., & Hu, G. F. (2009). Neamine Inhibits prostate cancer growth by suppressing angiogenin-mediated rRNA transcription. *Clinical Cancer Research*, 15(6). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2593>
- Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Molecular Cell*, 43(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>
- Iyer, S., Holloway, D. E., & Acharya, K. R. (2013). Crystal structures of murine angiogenin-2 and -3 - Probing "structure - Function" relationships amongst angiogenin homologues. *FEBS Journal*, 280(1). <https://doi.org/10.1111/febs.12071>
- Jackson, D. Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., & Wells, J. A. (1994). A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science*, 266(5183). <https://doi.org/10.1126/science.7939659>
- Jans, D. A., Xiao, C. Y., & Lam, M. H. C. (2000). Nuclear targeting signal recognition: A key control point in nuclear transport? In *BioEssays* (Vol. 22, Issue 6). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200006\)22:6<532::AID-BIES6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6<532::AID-BIES6>3.0.CO;2-O)
- Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011024>

- Johnson, C. L., Lu, D., Huang, J., & Basu, A. (2002). Regulation of p53 stabilization by DNA damage and protein kinase C. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(10).
- Jones, M. L., Ewing, C. M., Isaacs, W. B., & Getzenberg, R. H. (2012). Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01283.x>
- Joo Yeo, K., Hwang, E., Min, K. M., Jee, J. G., Lee, C. K., Hwang, K. Y., Jeon, Y. H., Chang, S. I., & Cheong, H. K. (2014). The dual binding site of angiogenin and its inhibition mechanism: The crystal structure of the rat angiogenin-heparin complex. *Chemical Communications*, 50(85). <https://doi.org/10.1039/c4cc05175k>
- Kelemen, B. R., Klink, T. A., Behlke, M. A., Eubanks, S. R., Leland, P. A., & Raines, R. T. (1999). Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Research*, 27(18). <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.3696>
- Kelemen, B. R., Schultz, L. W., Sweeney, R. Y., & Raines, R. T. (2000). Excavating an active site: The nucleobase specificity of ribonuclease A. *Biochemistry*, 39(47). <https://doi.org/10.1021/bi001862f>
- Kieran, D., Sebastia, J., Greenway, M. J., King, M. A., Connaughton, D., Concannon, C. G., Fenner, B., Hardiman, O., & Prehn, J. H. M. (2008). Control of motoneuron survival by angiogenin. *Journal of Neuroscience*, 28(52). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3399-08.2008>
- Kim, H. M., Kang, D. K., Kim, H. Y., Kang, S. S., & Chang, S. I. (2007). Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.047>
- Kim, Y. N., & Kim, D. H. (2012). Decreased serum angiogenin level in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(2). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.02.010>
- Kishikawa, H., Wu, D., & Hu, G. F. (2008). Targeting angiogenin in therapy of amyotrophic lateral sclerosis. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 12, Issue 10). <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1229>

- Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A., & Hu, G. F. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, *24*(3). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208223>
- Koczera, P., Martin, L., Marx, G., & Schuerholz, T. (2016). The ribonuclease a superfamily in humans: Canonical RNases as the buttress of innate immunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081278>
- Kralj, M., Husnjak, K., Körbler, T., & Pavelić, J. (2003). Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. *Cancer Gene Therapy*, *10*(6). <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700588>
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1803, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.10.009>
- Krishna, T. S. R., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., & Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, *79*(7). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90014-0)
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, *387*(6630). <https://doi.org/10.1038/387299a0>
- Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korb, J. O., Huber, W., & Steinmetz, L. M. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a hela cell line. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *3*(8). <https://doi.org/10.1534/g3.113.005777>
- Lee, F. S., Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Tight-Binding Inhibition of Angiogenin and Ribonuclease A by Placental Ribonuclease Inhibitor. *Biochemistry*, *28*(1). <https://doi.org/10.1021/bi00427a031>
- Lee, F. S., & Vallee, B. L. (1989). Characterization of ribonucleolytic activity of angiogenin towards tRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *161*(1). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91569-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91569-6)
- Lee, H. H., Wang, Y. N., & Hung, M. C. (2019a). Functional roles of the human ribonuclease A superfamily in RNA metabolism and membrane receptor biology. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.03.003>

- Lee, H. H., Wang, Y. N., & Hung, M. C. (2019b). Functional roles of the human ribonuclease A superfamily in RNA metabolism and membrane receptor biology. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.03.003>
- Leland, P. A., Staniszewski, K. E., Park, C., Kelemen, B. R., & Raines, R. T. (2002). The ribonucleolytic activity of angiogenin. *Biochemistry*, *41*(4), 1343–1350. <https://doi.org/10.1021/bi0117899>
- Leonidas, D. D., Shapiro, R., Allen, S. C., Subbarao, G. V., Veluraja, K., & Acharya, K. R. (1999). Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: Implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumour growth. *Journal of Molecular Biology*, *285*(3). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2378>
- Leung, W., Baxley, R. M., Moldovan, G. L., & Bielinsky, A. K. (2019). Mechanisms of DNA damage tolerance: post-translational regulation of PCNA. In *Genes* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/genes10010010>
- Li, S., Chen, Y., Sun, D., Bai, R., Gao, X., Yang, Y., Sheng, J., & Xu, Z. (2018). Angiogenin Prevents Progranulin A9D Mutation-Induced Neuronal-Like Cell Apoptosis Through Cleaving tRNAs into tiRNAs. *Molecular Neurobiology*, *55*(2). <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0396-7>
- Li, S., Goncalves, K. A., Lyu, B., Yuan, L., & Hu, G. fu. (2020). Chemosensitization of prostate cancer stem cells in mice by angiogenin and plexin-B2 inhibitors. *Communications Biology*, *3*(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0750-6>
- Li, S., & Hu, G. F. (2012). Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 227, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/jcp.23051>
- Li, S., Ibaragi, S., & Hu, G. (2012). Angiogenin as a Molecular Target for the Treatment of Prostate Cancer. *Current Cancer Therapy Reviews*, *7*(2). <https://doi.org/10.2174/1573394711107020083>
- Li, S., Shi, X., Chen, M., Xu, N., Sun, D., Bai, R., Chen, H., Ding, K., Sheng, J., & Xu, Z. (2019). Angiogenin promotes colorectal cancer metastasis via tiRNA production. *International Journal of Cancer*, *145*(5). <https://doi.org/10.1002/ijc.32245>

- Li, Z., Ender, C., Meister, G., Moore, P. S., Chang, Y., & John, B. (2012). Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 40(14). <https://doi.org/10.1093/nar/gks307>
- Liu, H. Y., Chen, C. Y., Hung, Y. F., Lin, H. R., Chao, H. W., Shih, P. Y., Chuang, C. N., Li, W. P., Huang, T. N., & Hsueh, Y. P. (2018). Rnase a promotes proliferation of neuronal progenitor cells via an ERK-dependent pathway. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00428>
- Liu, X., Chai, Y., Liu, G., Su, W., Guo, Q., Lv, X., Gao, P., Yu, B., Ferbeyre, G., Cao, X., & Wan, M. (2021). Osteoclasts protect bone blood vessels against senescence through the angiogenin/plexin-B2 axis. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22131-1>
- Lixin, R., Efthymiadis, A., Henderson, B., & Jans, D. A. (2001). Novel properties of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(1). <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4953>
- Lu, L., Li, J., Moussaoui, M., & Boix, E. (2018). Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01012>
- Lv, H., Liu, G., Li, K., Li, M., & Zhang, D. (2019). Angiogenin regulates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma through upregulation of HMGA2. *Pharmazie*, 74(5). <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8943>
- Lyons, S. M., Achorn, C., Kedersha, N. L., Anderson, P. J., & Ivanov, P. (2016). YB-1 regulates tiRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic Acids Research*, 44(14). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw418>
- Lyons, S. M., Fay, M. M., Akiyama, Y., Anderson, P. J., & Ivanov, P. (2017). RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1272746>
- Mao, M., Chen, W., & Ye, D. (2024). Research progress on the structure, function, and use of angiogenin in malignant tumours. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30654>
- Marzo, T., Ferraro, G., Cucci, L. M., Pratesi, A., Hansson, Ö., Satriano, C., Merlino, A., & La Mendola, D. (2022). Oxaliplatin inhibits angiogenin proliferative and cell migration effects in

- prostate cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111657>
- Mayer, C., & Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. In *Oncogene* (Vol. 25, Issue 48). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209883>
- Mittelman, D., & Wilson, J. H. (2013). The fractured genome of HeLa cells. *Genome Biology*, 14(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-111>
- Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoa, E., & Rosser, C. J. (2015). Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene*, 34(7). <https://doi.org/10.1038/onc.2014.2>
- Moghadam, M., Ganji, A., Varasteh, A., Falak, R., & Sankian, M. (2015). Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 4(1).
- Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. In *Cell* (Vol. 129, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Monti, D. M., Yu, W., Pizzo, E., Shima, K., Hu, M. G., Di Malta, C., Piccoli, R., D'Alessio, G., & Hu, G. F. (2009). Characterization of the angiogenic activity of zebrafish ribonucleases. *FEBS Journal*, 276(15). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07115.x>
- Moroianu, J., & Riordan, J. F. (1994a). Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(3). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2391>
- Moroianu, J., & Riordan, J. F. (1994b). Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1677>
- Moussaoui, M., Cuchillo, C. M., & Nogués, M. V. (2007). A phosphate-binding subsite in bovine pancreatic ribonuclease A can be converted into a very efficient catalytic site. *Protein Science*, 16(1). <https://doi.org/10.1110/ps.062251707>
- Narayanan, C., Bernard, D. N., Bafna, K., Gagné, D., Chennubhotla, C. S., Doucet, N., & Agarwal, P. K. (2018). Conservation of Dynamics Associated with Biological Function in an Enzyme Superfamily. *Structure*, 26(3). <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.015>

- Palmer, K. A., Scheraga, H. A., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). A preliminary three-dimensional structure of angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.83.7.1965>
- Panda, A., Halder, K., Debnath, D., De, S., & Dasgupta, S. (2022). Thermodynamics of the Association of Aminoglycoside Antibiotics with Human Angiogenin. *Protein & Peptide Letters*, 30(1). <https://doi.org/10.2174/0929866530666221021111823>
- Papageorgiou, A. C., Shapiro, R., & Acharya, K. R. (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor - An X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO Journal*, 16(17). <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5162>
- Papaoiannou, O. S. E., Tsika, A. C., Rovoli, M., Papadopoulos, G. E., Kontopidis, G., Spyroulias, G. A., & Leonidas, D. D. (2023). Structural and Biochemical Characterization of the Human Angiogenin-Proliferating Cell Nuclear Antigen Interaction. *Biochemistry*, 62(11). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00158>
- Peng, Y., Li, L., Huang, M., Duan, C., Zhang, L., & Chen, J. (2014). Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cellular Signalling*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.021>
- Peres, R., Furuya, H., Pagano, I., Shimizu, Y., Hokutan, K., & Rosser, C. J. (2016). Angiogenin contributes to bladder cancer tumorigenesis by DNMT3b-mediated MMP2 activation. *Oncotarget*, 7(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10097>
- Pinoteau, M.-A. (2019). *À la recherche de modulateurs allostériques de l'angiogénine*.
- Pizzo, E., Sarcinelli, C., Sheng, J., Fusco, S., Formiggini, F., Netti, P., Yu, W., D'Alessio, G., & Hu, G. F. (2013). Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *Journal of Cell Science*, 126(18). <https://doi.org/10.1242/jcs.134551>
- Popov, A., Smirnov, E., Kováčik, L., Raška, O., Hagen, G., Stixová, L., & Raška, I. (2013). Duration of the first steps of the human rRNA processing. *Nucleus (United States)*, 4(2). <https://doi.org/10.4161/nucl.23985>
- Prehn, J. H. M., & Jirstrom, E. (2020). Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0375-9>

- Pyatibratov, M. G., & Kostyukova, A. S. (2012). New Insights into the Role of Angiogenin in Actin Polymerization. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 295). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00011-3>
- Pyatibratov, M. G., Tolkatchev, D., Plamondon, J., Xu, P., Ni, F., & Kostyukova, A. S. (2010). Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495(1). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.024>
- Raghu, H., Lakka, S. S., Gondi, C. S., Mohanam, S., Dinh, D. H., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2010). Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012458>
- Raines, R. T., Toscano, M. P., Nierengarten, D. M., Ha, J. H., & Auerbach, R. (1995). Replacing a surface loop endows ribonuclease A with angiogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17180>
- Rashad, S., Niizuma, K., & Tominaga, T. (2020). TRNA cleavage: A new insight. *Neural Regeneration Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264447>
- Razavi, Z. S., Asgarpour, K., Mahjoubin-Tehran, M., Rasouli, S., Khan, H., Shahrzad, M. K., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2021). Angiogenesis-related non-coding RNAs and gastrointestinal cancer. In *Molecular Therapy Oncolytics* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.04.002>
- Rogers, D. M., Jasim, S. B., Dyer, N. T., Auvray, F., Réfrégiers, M., & Hirst, J. D. (2019). Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. In *Chem* (Vol. 5, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.07.008>
- Russo, N., Acharya, K. R., Vallee, B. L., & Shapiro, R. (1996). A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.804>
- Russo, N., Shapiro, R., Acharya, K. R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2920>
- Sadagopan, S., Sharma-Walia, N., Veettil, M. V., Bottero, V., Levine, R., Vart, R. J., & Chandran, B. (2009). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Upregulates Angiogenin during Infection of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, Which Induces 45S rRNA

- Synthesis, Antiapoptosis, Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis. *Journal of Virology*, 83(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.02052-08>
- Sadagopan, S., Veetil, M. V., Chakraborty, S., Sharma-Walia, N., Paudel, N., Bottero, V., & Chandran, B. (2012). Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene*, 31(46). <https://doi.org/10.1038/onc.2011.648>
- Saikia, M., Krokowski, D., Guan, B. J., Ivanov, P., Parisien, M., Hu, G. F., Anderson, P., Pan, T., & Hatzoglou, M. (2012). Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371799>
- Saxena, S. K., Rybak, S. M., Davey, R. T., Youle, R. J., & Ackerman, E. J. (1992). Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36710-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36710-9)
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., & Lyko, F. (2010). RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes and Development*, 24(15). <https://doi.org/10.1101/gad.586710>
- Schwartz, L., Cohen, A., Thomas, J., & Spencer, J. D. (2018). The immunomodulatory and antimicrobial properties of the vertebrate ribonuclease A superfamily. In *Vaccines* (Vol. 6, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/vaccines6040076>
- Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). Characteristic Ribonucleolytic Activity of Human Angiogenin. *Biochemistry*, 25(12). <https://doi.org/10.1021/bi00360a008>
- Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1987). Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2238>
- Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1992). Identification of Functional Arginines in Human Angiogenin By Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 31(49). <https://doi.org/10.1021/bi00164a026>
- Sheng, J., & Xu, Z. (2016). Three decades of research on angiogenin: A review and perspective. In *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Vol. 48, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv131>
- Sheng, J., Yu, W., Gao, X., Xu, Z., & Hu, G. F. (2014). Angiogenin stimulates ribosomal RNA transcription by epigenetic activation of the ribosomal DNA promoter. *Journal of Cellular Physiology*, 229(4). <https://doi.org/10.1002/jcp.24477>

- Shu, J., Huang, M., Tian, Q., Shui, Q., Zhou, Y., & Chen, J. (2015). Downregulation of angiogenin inhibits the growth and induces apoptosis in human bladder cancer cells through regulating AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of Molecular Histology*, 46(2). <https://doi.org/10.1007/s10735-014-9608-x>
- Simons, M., & Horowitz, A. (2001). Syndecan-4-mediated signalling. In *Cellular Signalling* (Vol. 13, Issue 12). [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00190-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00190-5)
- Skorupa, A., King, M. A., Aparicio, I. M., Dussmann, H., Coughlan, K., Breen, B., Kieran, D., Concannon, C. G., Marin, P., & Prehn, J. H. M. (2012). Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia. *Journal of Neuroscience*, 32(15). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6366-11.2012>
- Skorupa, A., Urbach, S., Vigy, O., King, M. A., Chaumont-Dubel, S., Prehn, J. H. M., & Marin, P. (2013). Angiogenin induces modifications in the astrocyte secretome: Relevance to amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Proteomics*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.07.028>
- Soncin, F., Strydom, D. J., & Shapiro, R. (1997). Interaction of heparin with human angiogenin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9818>
- Sorrentino, S. (2010). The eight human "canonical" ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.018>
- Soussi, T. (2000). The p53 tumor suppressor gene: From molecular biology to clinical investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 910. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06705.x>
- Steidinger, T. U., Slone, S. R., Ding, H., Standaert, D. G., & Yacoubian, T. A. (2013). Angiogenin in Parkinson Disease Models: Role of Akt Phosphorylation and Evaluation of AAV-Mediated Angiogenin Expression in MPTP Treated Mice. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056092>
- Steidinger, T. U., Standaert, D. G., & Yacoubian, T. A. (2011). A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 116(3). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07112.x>
- Subramanian, V., Crabtree, B., & Acharya, K. R. (2008). Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite

- extension/ pathfinding and survival of motor neurons. *Human Molecular Genetics*, 17(1).  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm290>
- Sultana, M. F., Abo, H., & Kawashima, H. (2022). Human and mouse angiogenins: Emerging insights and potential opportunities. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1022945>
- Sun, D., Han, C., & Sheng, J. (2022). The role of human ribonuclease A family in health and diseases: A systematic review. In *iScience* (Vol. 25, Issue 11).  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105284>
- Tao, E. W., Cheng, W. Y., Li, W. L., Yu, J., & Gao, Q. Y. (2020). tiRNAs: A novel class of small noncoding RNAs that helps cells respond to stressors and plays roles in cancer progression. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/jcp.29057>
- Thiyagarajan, N., Ferguson, R., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2012). Structural and molecular insights into the mechanism of action of human angiogenin-ALS variants in neurons. *Nature Communications*, 3. <https://doi.org/10.1038/ncomms2126>
- Thomas, S. P., Hoang, T. T., Ressler, V. T., & Raines, R. T. (2018). Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor. *RNA*, 24(8).  
<https://doi.org/10.1261/rna.065516.117>
- Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J., & Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA*, 14(10).  
<https://doi.org/10.1261/rna.1232808>
- Tran, T. T. Q., Narayanan, C., Loes, A. N., Click, T. H., Pham, N. T. H., Létourneau, M., Harms, M. J., Calmettes, C., Agarwal, P. K., & Doucet, N. (2024). Ancestral sequence reconstruction dissects structural and functional differences among eosinophil ribonucleases. *Journal of Biological Chemistry*, 300(5). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107280>
- Trendelenburg, G., & Dirnagl, U. (2005). Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: Focus on ischemic preconditioning. In *GLIA* (Vol. 50, Issue 4).  
<https://doi.org/10.1002/glia.20204>
- Trouillon, R., Kang, D. K., Chang, S. I., & O'hare, D. (2011). Angiogenin induces nitric oxide release independently from its RNase activity. *Chemical Communications*, 47(12).  
<https://doi.org/10.1039/c0cc04527f>

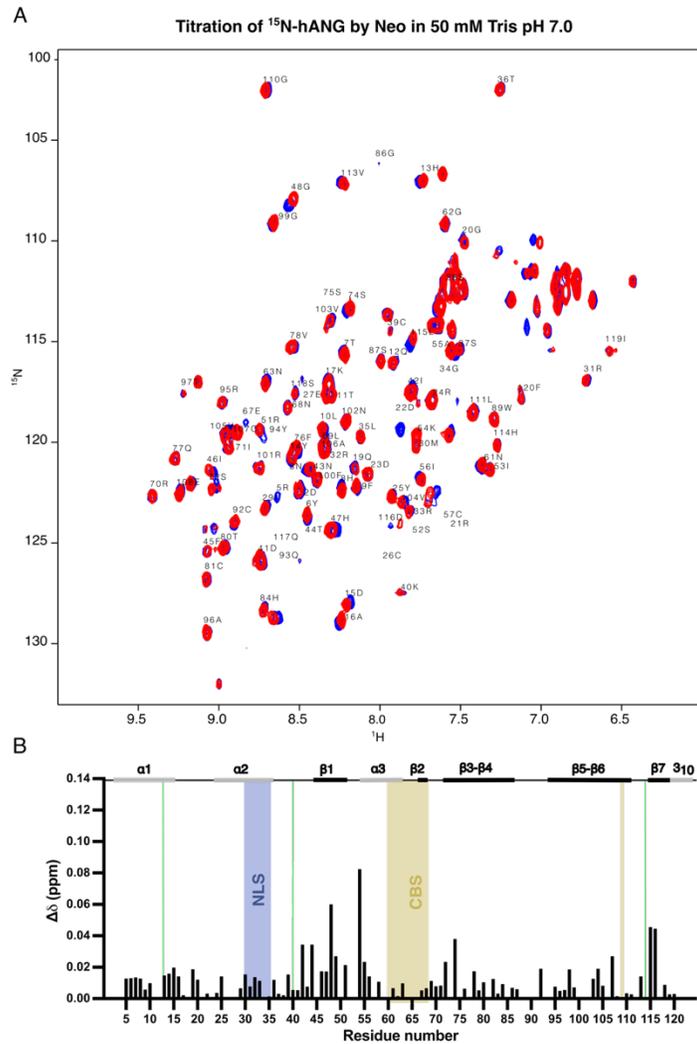
- Trouillon, R., Kang, D. K., Chang, S. I., & O'Hare, D. (2022). Neomycin, but Not Neamine, Blocks Angiogenic Factor Induced Nitric Oxide Release through Inhibition of Akt Phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232315277>
- Trouillon, R., Kang, D. K., Park, H., Chang, S. I., & Ohare, D. (2010). Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and akt kinases. *Biochemistry*, 49(15). <https://doi.org/10.1021/bi902122w>
- Tsika, A. C., Chatzileontiadou, D. S. M., Leonidas, D. D., & Spyroulias, G. A. (2016). NMR study of Met-1 human Angiogenin: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N backbone and side-chain resonance assignment. *Biomolecular NMR Assignments*, 10(2). <https://doi.org/10.1007/s12104-016-9704-9>
- Tsuji, T., Sun, Y., Kishimoto, K., Olson, K. A., Liu, S., Hirukawa, S., & Hu, G. F. (2005). Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. *Cancer Research*, 65(4). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2058>
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., & Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. In *Biotechnology Progress* (Vol. 20, Issue 5). <https://doi.org/10.1021/bp0498793>
- Van Es, M. A., Schelhaas, H. J., Van Vught, P. W. J., Ticozzi, N., Andersen, P. M., Groen, E. J. N., Schulte, C., Blauw, H. M., Koppers, M., Diekstra, F. P., Fumoto, K., Leclerc, A. L., Keagle, P., Bloem, B. R., Scheffer, H., Van Nuenen, B. F. L., Van Blitterswijk, M., Van Rheenen, W., Wills, A. M., ... Van Den Berg, L. H. (2011). Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. In *Annals of Neurology* (Vol. 70, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/ana.22611>
- Vanli, N., & Guo-Fu, H. U. (2015). Mechanism and Function of Angiogenin in Prostate Cancer. *Zhongguo Sheng Wu Hua Xue Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Bao = Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12). <https://doi.org/10.13865/j.cnki.cjbmb.2015.12.06>
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: Intermediacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and p53-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24). <https://doi.org/10.1074/jbc.M400944200>
- Wang, Y. N., Lee, H. H., Chou, C. K., Yang, W. H., Wei, Y., Chen, C. Te, Yao, J., Hsu, J. L., Zhu, C., Ying, H., Ye, Y., Wang, W. J., Lim, S. O., Xia, W., Ko, H. W., Liu, X., Liu, C. G., Wu, X.,

- Wang, H., ... Hung, M. C. (2018). Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 33(4). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.012>
- Wei, S., Gao, X., Du, J., Su, J., & Xu, Z. (2011). Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028797>
- Weng, C., Dong, H., Bai, R., Sheng, J., Chen, G., Ding, K., Lin, W., Chen, J., & Xu, Z. (2022). Angiogenin promotes angiogenesis via the endonucleolytic decay of miR-141 in colorectal cancer. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.01.017>
- Weng, C., Dong, H., Mao, J., Lang, X., & Chen, J. (2022). Characterization and Function of the Interaction of Angiogenin With Alpha-Actinin 2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.837971>
- Wu, D., Yu, W., Kishikawa, H., Folkerth, R. D., Iafrate, A. J., Shen, Y., Xin, W., Sims, K., & Hu, G. F. (2007). Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 62(6). <https://doi.org/10.1002/ana.21221>
- Wu, J., Kong, M., Lou, Y., Li, L., Yang, C., Xu, H., Cui, Y., Hao, H., & Liu, Z. (2021). Simultaneous Activation of Erk1/2 and Akt Signaling is Critical for Formononetin-Induced Promotion of Endothelial Function. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.608518>
- Wu, W., Lee, I., Spratt, H., Fang, X., & Bao, X. (2021). tRNA-Derived Fragments in Alzheimer's Disease: Implications for New Disease Biomarkers and Neuropathological Mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 79(2). <https://doi.org/10.3233/JAD-200917>
- Xia, W., Fu, W., Cai, X., Wang, M., Chen, H., Xing, W., Wang, Y., Zou, M., Xu, T., & Xu, D. (2015). Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF-κB signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116983>
- Xu, J., Miao, H., Zou, L., Tse Sum Bui, B., Haupt, K., & Pan, G. (2021). Evolution of Molecularly Imprinted Enzyme Inhibitors: From Simple Activity Inhibition to Pathological Cell Regulation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 60(46). <https://doi.org/10.1002/anie.202106657>

- Xu, Z. ping, Tsuji, T., Riordan, J. F., & Hu, G. fu. (2002). The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2). [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00479-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00479-5)
- Xu, Z. ping, Tsuji, T., Riordan, J. F., & Hu, G. fu. (2003). Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry*, 42(1). <https://doi.org/10.1021/bi020465x>
- Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F., & Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *Journal of Cell Biology*, 185(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.200811106>
- Yang, D., Alpey, M. S., & MacNeill, S. A. (2023). Non-canonical binding of the Chaetomium thermophilum PolD4 N-terminal PIP motif to PCNA involves Q-pocket and compact 2-fork plug interactions but no 310 helix. *FEBS Journal*, 290(1). <https://doi.org/10.1111/febs.16590>
- Yeo, K. J., Jee, J. G., Hwang, E., Kim, E. H., Jeon, Y. H., & Cheong, H. K. (2017). Interaction between human angiogenin and the p53 TAD2 domain and its implication for inhibitor discovery. *FEBS Letters*, 591(23). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12899>
- Yeo, K. J., Jee, J. G., Park, J. W., Lee, Y. J., Ryu, K. S., Kwon, B. M., Jeon, Y. H., & Cheong, H. K. (2016). The role of the KRSIK motif of human angiogenin in heparin and DNA binding. *RSC Advances*, 6(86), 82644–82647. <https://doi.org/10.1039/c6ra14599j>
- Yoshioka, N., Wang, L., Kishimoto, K., Tsuji, T., & Hu, G. F. (2006). A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.0606708103>
- Yu, W., Goncalves, K. A., Li, S., Kishikawa, H., Sun, G., Yang, H., Vanli, N., Wu, Y., Jiang, Y., Hu, M. G., Friedel, R. H., & Hu, G. fu. (2017). Plexin-B2 Mediates Physiologic and Pathologic Functions of Angiogenin. *Cell*, 171(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.005>
- Zhang, J., Dyer, K. D., & Rosenberg, H. F. (2003). Human RNase 7: A new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg157>

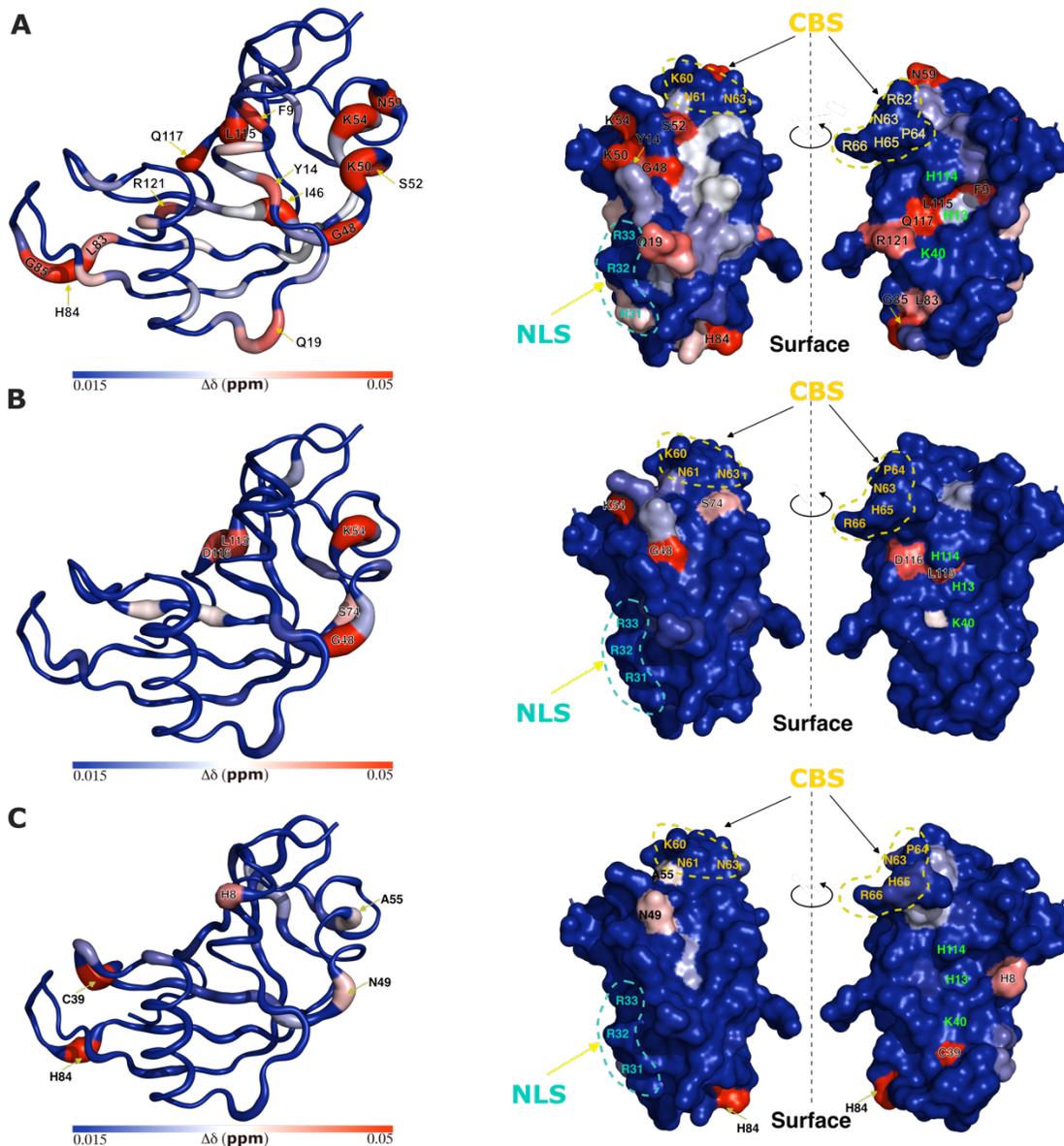
## 6 ANNEXE

### 6.1 Figure

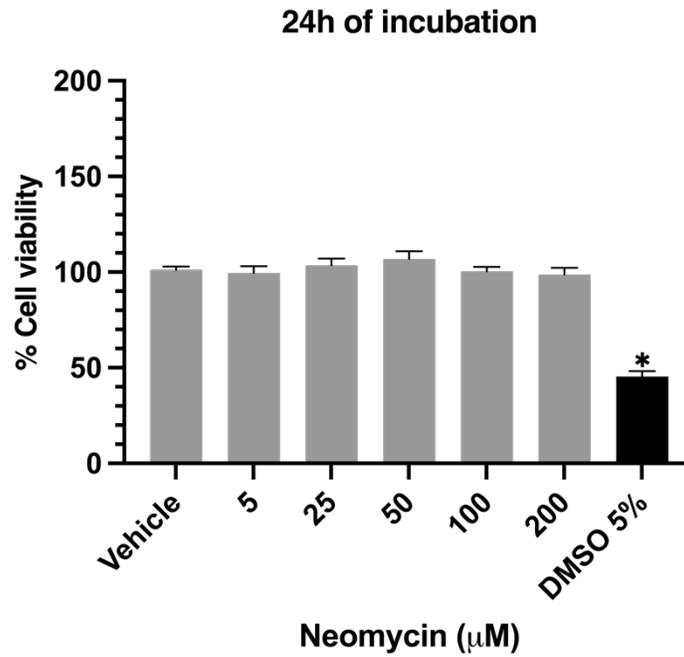


**Figure S1. Titration RMN de  $^{15}\text{N}$ -hANG par Neo dans 50 mM de Tris, pH 7,0.** A. Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de hANG apo (rouge) et titré par Neo (bleu) à un rapport molaire de 60:1 (Neo:hANG). B. Perturbations des déplacements chimiques composés (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de hANG en présence de Neo. Les éléments de structure secondaire de hANG sont affichés au-dessus de l'alignement : hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ , rectangles gris), brins- $\beta$  ( $\beta$ , rectangles noirs) et coude aléatoire (ligne noire fine). Les résidus actifs conservés H13, K40 et H114 sont identifiés par des barres vertes au-dessus de l'alignement. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est coloré en violet-bleu et le segment de liaison cellulaire (CBS) est coloré en jaune-brun.

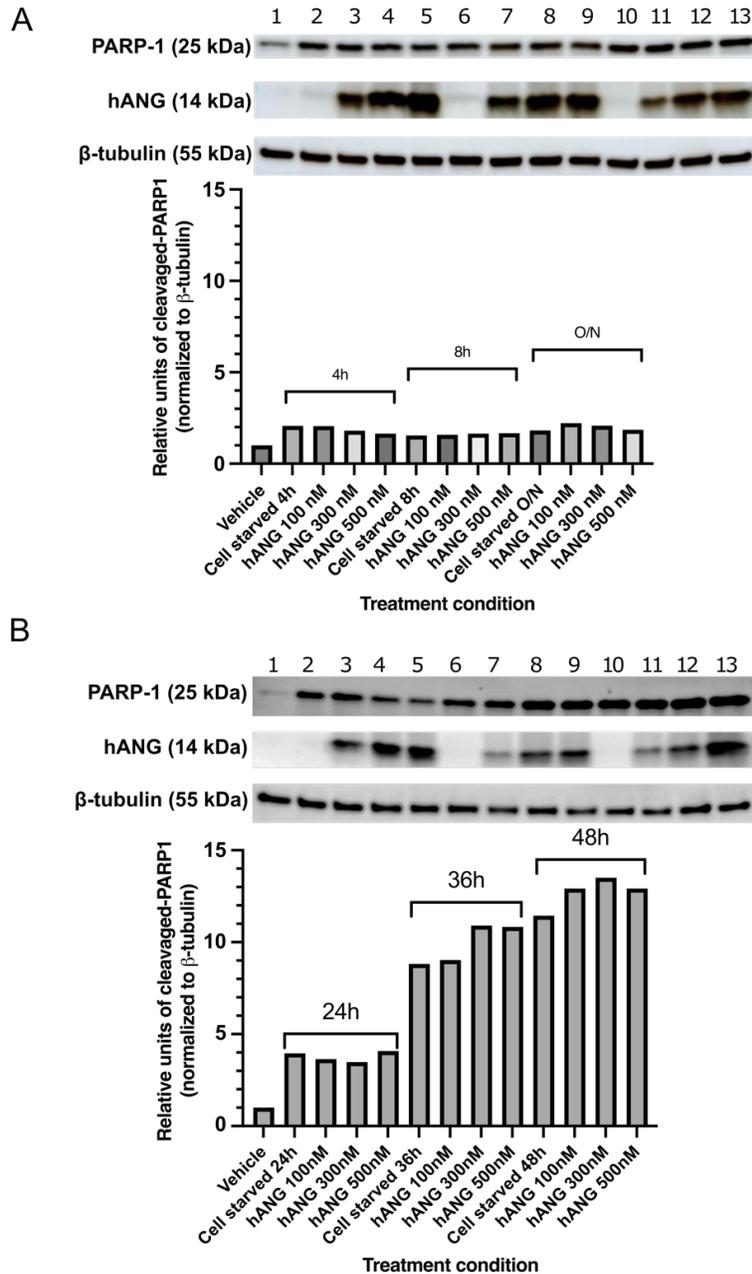




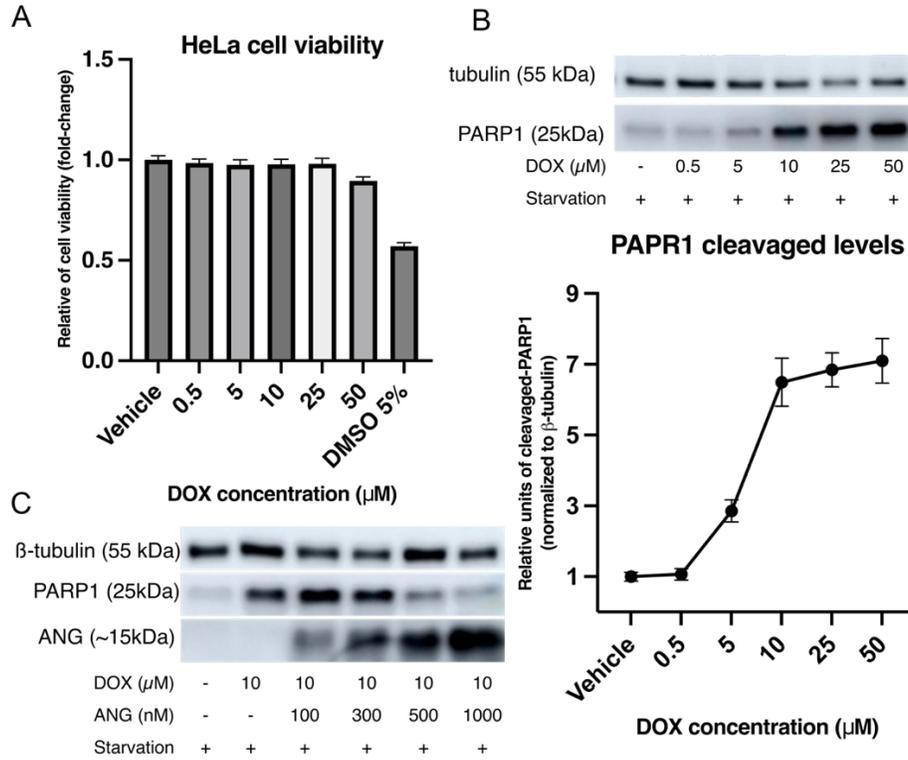
**Figure S3. Sites de liaison potentiels du composé Neo sur la structure de hANG basés sur les perturbations composées des déplacements chimiques  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  RMN dans différents tampons de titrage.** A. 15 mM d'acétate de sodium, pH 5,0. B. 50 mM de Tris, pH 7,0. C. 20 mM de phosphate de sodium, pH 6,5. Tous les échantillons ont une concentration de 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Les perturbations des déplacements chimiques (CSP,  $\Delta\delta$  ppm) pour chaque résidu (images dans la colonne de gauche) sont indiquées à la fois par la couleur et la largeur du modèle en pâte (coloré sur une plage bleu-blanc-rouge) : facteur min 0,015 ppm, facteur max 0,05 ppm. Surface colorée de hANG montrant les perturbations des déplacements chimiques (images dans la colonne de droite) qui illustrent les sites de liaison potentiels des composés. La surface des résidus actifs conservés H13, K40 et H114 est identifiée par des étiquettes vertes. La région NLS ( $^{31}\text{RRR}^{33}$ ) est indiquée par le cercle en pointillés cyan, et la région CBS ( $^{60}\text{KNRNPHR}^{66}$ ) est marquée par le cercle en pointillés orange. Les résidus montrant des valeurs de CSP significativement modifiées sont désignés par des étiquettes noires à côté de leurs positions respectives dans la séquence d'acides aminés. La figure a été réalisée avec PyMOL (version Open-Source 2.5.0) en utilisant la structure de hANG (PDB 1B1I).



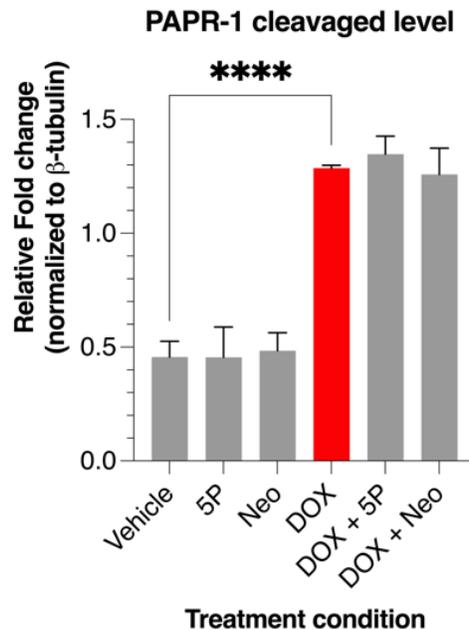
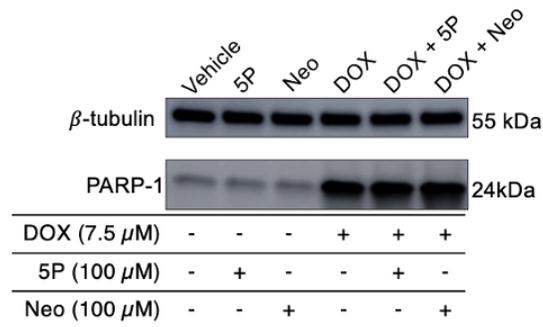
**Figure S4. Viabilité des cellules HeLa après traitement avec de la néomycine (5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 μM) pendant 24h.** Le véhicule (contrôle négatif) est des cellules non traitées par hANG ou des composés, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la possible cytotoxicité. 5% DMSO (comme contrôle positif de la possible toxicité à court terme). L'analyse statistique est basée sur l'ANOVA à un facteur (\* $p < 0,05$ ). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.



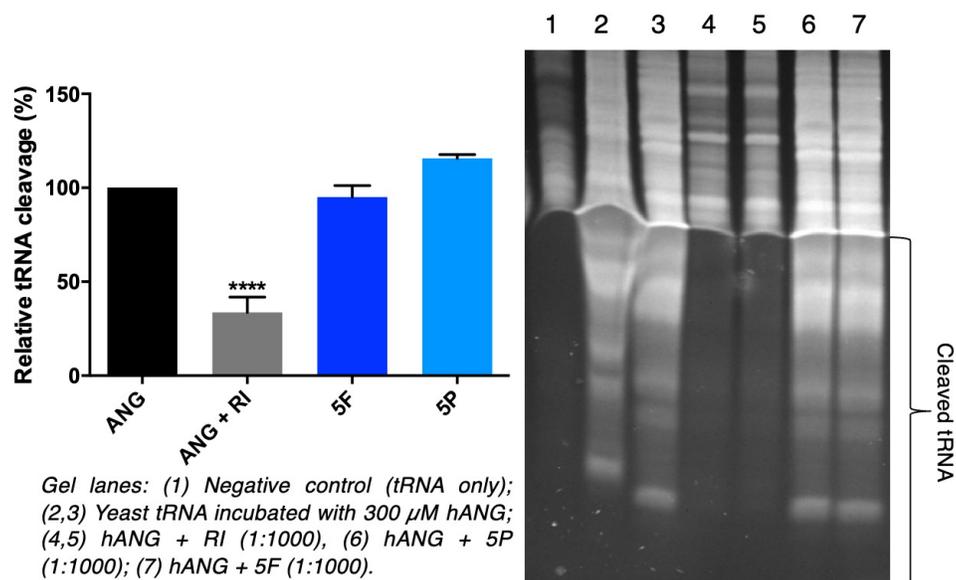
**Figure S5. L'impact de la privation de sérum sur le niveau de clivage de PARP-1 de 24 kDa et l'effet protecteur de hANG contre la privation de sérum dans les cellules ont été mesurés par immunobuvardage de type Western.** A. PARP-1 de 24 kDa dans les cellules privées de sérum pendant 4h à une nuit. (1) Le véhicule (contrôle négatif) est des cellules non traitées par hANG, placées dans un milieu avec sérum tout au long de l'expérience, pour évaluer le signal de fond de l'expérience. (2 ; 6 ; 10) Cellules privées de sérum pendant 4h, 8h ou une nuit, respectivement. (3, 7, 11) Cellules traitées avec 100 nM de hANG. (4, 8, 12) Cellules traitées avec 300 nM de hANG. (5, 9, 13) Cellules traitées avec 500 nM de hANG. B. PARP-1 de 24 kDa dans les cellules privées de sérum pendant 24h à 48h. (1) Véhicule. (2 ; 6 ; 10) Cellules privées de sérum pendant 24h, 36h ou 48h, respectivement. (3, 7, 11) Cellules traitées avec 100 nM de hANG. (4, 8, 12) Cellules traitées avec 300 nM de hANG. (5, 9, 13) Cellules traitées avec 500 nM de hANG.



**Figure S6. Optimisation de la concentration de doxorubicine pour le test d'apoptose cellulaire.** A. Viabilité des cellules HeLa après traitement avec de la doxorubicine (0,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 μM) pendant 4h. Ensuite, la viabilité cellulaire a été mesurée en ajoutant le réactif Cell-titer blue. L'absorbance a été enregistrée sur TECAN à 560nmEx/590nmEm. B. Niveaux de clivage de PARP1 (25kDa) à différentes concentrations de DOX. Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à une densité de 750 000 cellules/puits et incubées une nuit à 37°C. Les cellules ont d'abord été privées de sérum pendant 2h ; les cellules ont ensuite été traitées avec du DOX (0,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 μM) pendant 4h. Le véhicule (contrôle négatif) sont des cellules non traitées par DOX, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la réponse apoptotique induite par DOX. Enfin, les extraits de cellules entières ont été homogénéisés et resuspendus dans un tampon RIPA et vérifiées par immunobuvardage de type Western. La courbe de réponse à la dose a été construite sur Prism. C. Activité protectrice de hANG à ses différentes concentrations sous apoptose cellulaire induite par DOX. Les résultats sont les moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes.



**Figure S7.** L'effet des composés (5P, Neo) sur le clivage d'un fragment de 24 kDa de la PARP-1 par immunobuvardage de type Western. Les échantillons ont été traités avec les composés individuels 5P, Neo, ou une combinaison de 5P + DOX et Neo + DOX. Les concentrations de 5P et Neo étaient de 100  $\mu$ M, tandis que le DOX a été utilisé à 7,5  $\mu$ M dans le test. Le véhicule (contrôle négatif) sont des cellules non traitées par composés (5P, neo) et DOX, placées dans un milieu sans sérum tout au long de l'expérience, comme contrôle négatif de la réponse apoptotique induite par DOX. Les résultats ont indiqué que 5P et Neo n'ont pas affecté de manière significative les niveaux du fragment de 24 kDa de PARP-1 dans les cellules traitées avec les composés seuls ou en combinaison avec l'inducteur d'apoptose DOX. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.



**Figure S8.** L'effet des composés (5P, 5F) sur l'activité ribonucléolytique de hANG *in vitro* vérifié sur gel d'acrylamide TBE/urée à 15%. L'ARNt de levure a été incubé avec hANG en présence d'inhibiteur de ribonucléase (RI), ou des composés. Les résultats ont montré que, bien que le RI soit connu pour inhiber la capacité de hANG à catalyser le clivage de l'ARNt, la présence de composés (5P, 5F) à une concentration molaire de 1:1000 n'a pas montré un effet significatif sur la capacité de hANG à cliver l'ARNt *in vitro*. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

## 6.2 Milieu

- **BASE MJ MEDIUM** (pour préparer 1000 mL de la solution):

1. Ajoutez les réactifs suivants :
  - a. 2,5 g de chlorure d'ammonium  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (M.M. 54,49)
  - b. 9,0 g de phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
  - c. 6,0 g de phosphate de potassium dibasique ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
  - d. 0,57 g de citrate de sodium dihydraté ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
2. Ajoutez 950 mL d'eau milliQ et mélangez jusqu'à dissolution complète.
3. Ajustez le pH à 6,6.
4. Complétez à 1000 mL avec de l'eau milliQ.
5. Stérilisez par autoclavage.
6. Conservez à 4°C.

- **MJ MEDIUM** (pour préparer 1000 mL de la solution):

1. Préparez la solution fraîchement.
2. Ajoutez les réactifs suivants à 900 mL de Base MJ Medium :
  - a. 900 mL de Base MJ Medium
  - b. 900  $\mu\text{L}$  de solution de métaux
  - c. 650  $\mu\text{L}$  de solution de vitamines MEM
  - d. 1000  $\mu\text{L}$  de 70 mg/mL de thiamine B1
  - e. 1000  $\mu\text{L}$  de 30 mg/mL de kanamycine
  - f. 7,5 mL de sulfate de magnésium 1 M ( $\text{MgSO}_4$ )
  - g. 19,5 mL de glucose 20%
3. Mélangez bien et utilisez immédiatement.

• **SOLUTION DE MÉTAUX** (pour préparer une solution de 200 mL):

1. Préparer 100 mL de milliQ-H<sub>2</sub>O à pH 1,0 en ajoutant de l'acide chlorhydrique.
2. Peser 2,7 g de Chlorure de Fer 6-Hydraté (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) M.M. 270,30.
3. Dissoudre le chlorure de fer dans l'eau préparée à l'étape 1.
4. Ajouter les réactifs suivants aux 100 mL :
  - a. 0,590 g de Chlorure de Calcium Dihydraté (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) M.M. 147,02
  - b. 0,340 g de Sulfate de Manganèse Monohydraté (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) M.M. 169,01
  - c. 0,580 g de Chlorure de Zinc (ZnCl<sub>2</sub>) M.M. 136,28
  - d. 0,095 g de Chlorure de Cobalt 6-Hydraté (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) M.M. 237,93
  - e. 0,100 g de Sulfate de Cuivre 5-Hydraté (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) M.M. 249,7
  - f. 0,110 g de Sulfate de Nickel 6-Hydraté (NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O) M.M. 262,86
  - g. 0,097 g de Molybdate de Sodium Dihydraté (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) M.M. 241,97
  - h. 0,025 g d'Acide Borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) M.M. 61,83
5. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
6. Compléter à 200 mL avec du milliQ-H<sub>2</sub>O.
7. Filtrer stérilement sur 22 µm.
8. Conserver à 4°C.