

Université de Montréal

**Définition du mécanisme de localisation des ARNm *cen* et  
*ik2* aux centrosomes chez la *Drosophila***

par  
Félix Legendre

Département de Biochimie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences  
en Biochimie  
option Génétique Moléculaire

Décembre, 2015

© Félix Legendre, 2015



## Résumé

L'organisation cellulaire repose sur une distribution organisée des macromolécules dans la cellule. Deux ARNm, *cen* et *ik2*, montrent une colocalisation parfaite aux centrosomes. Ces deux gènes font partie du même locus sur le chromosome 2L de *Drosophila melanogaster* et leur région 3' non traduite (3'UTR) se chevauchent. Dans le mutant *Cen*, le transport de *Ik2* est perturbé, mais dans le mutant *Ik2*, la localisation de *cen* n'est aucunement affectée. Ces résultats suggèrent que *cen* est le régulateur principal de la co-localisation de *cen* et *ik2* aux centrosomes et que cette co-localisation se produit par un mécanisme impliquant la région complémentaire au niveau du 3'UTR des deux transcrits. La localisation de *cen* au niveau des centrosomes dans les cellules épithéliales de l'embryon est conservée dans différentes espèces de *Drosophile* : *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. virilis* et *D. mojavensis*. Cependant, la localisation de *ik2* n'est pas conservée dans *D. virilis* et *D. mojavensis*, deux espèces dont les gènes *cen* et *ik2* sont dissociés dans le génome. Ces résultats suggèrent que la proximité de *Cen* et *Ik2* dans le génome est importante afin d'avoir un événement de co-localisation de ces deux transcrits. J'ai généré différentes lignées de mouches transgéniques dans lesquelles un transgène contenant la séquence GFP fusionnée à différentes parties de *Cen* (partie codante, 3'UTR, Cod+3'UTR) qui sont sous le contrôle du promoteur UAS et qui sont *gal4* inductibles. La région codante de l'ARNm *cen* était suffisante pour avoir un ciblage précis du transcrit aux centrosomes.

**Mots-clés** : Localisation des ARN, Centrosomes, Hybridation in situ de fluorescence, Embryogenèse.

## Abstract

Messenger RNA (mRNA) localization plays a key role in establishing cellular architecture and function. The *centrocortin* (*cen*) and *IκB Kinase-like 2* (*ik2*) mRNAs are co-localized to centrosomes in embryonic epithelial cells. Interestingly, both of these genes are organized in a head-to-head configuration in the genome, with their 3' untranslated regions (3'UTRs) overlapping on opposite DNA strands. Here we show that gene positioning of *cen* and *ik2* is important for the co-localization of these transcripts during *Drosophila* embryogenesis. The localization of *cen* is conserved within the *Drosophila* phylogeny and *ik2* cannot localize when it is separated from the *cen* locus. Also, loss of function mutants of *cen* show a complete loss of *ik2* localization, proposing that *cen* is the main driver of the co-localization. Structure-function analysis revealed that the coding region of *cen* is necessary for its centrosomal targeting, suggesting that a *cis*-regulatory motif that drives its localization is located in the coding region. This study reveals for the first time the importance of gene positioning for RNA localization. We suggest a model where *cen* mRNA is the main driver of centrosomal localization, which may occur through post-transcriptional interaction/annealing of these mRNAs via their 3'UTRs.

**Keywords** : mRNA localization, Centrosomes, Fluorescent in situ hybridization, Embryogenesis.

# Table des matières

<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Régulation de l'expression génique	1
1.2 Principes de l'organisation cellulaire	2
1.3 Importance de la localisation des ARNm	3
1.4 Mécanismes de localisation des ARNm	7
1.5 Prévalence de la localisation des ARNm	14
1.6 Localisation des ARNm au niveau de l'appareil mitotique	16
1.7 Transcrits anti-sens naturels	22
<b>2. Hypothèse et objectifs du projet de recherche</b>	<b>24</b>
<b>3. Matériel et méthodes</b>	<b>25</b>
<b>4. Présentation du manuscrit</b>	<b>34</b>
4.1 Introduction	35
4.2 Results	37
4.3 Discussion	46
4.4 Materials and methods	48
<b>5. Discussion</b>	<b>50</b>
<b>6. Conclusion</b>	<b>54</b>
<b>7. Bibliographie</b>	<b>i</b>
<b>8. Remerciements</b>	<b>x</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des ARNm localisés au niveau de l'appareil mitotique.

17

## Liste des figures

Fig 1. Représentation schématique du dogme central de la biologie moléculaire.	2
Fig 2. Exemples d'ARNm avec localisation particulière.	5
Fig 3. Étapes générales du transport des ARNm.	9
Fig 4. Mécanismes caractérisés de localisation des ARNm.	12
Fig 5. Exemples d'éléments de localisation identifiés dans certains transcrits.	13
Fig 6. Certains ARNm sont enrichis au niveau de l'appareil mitotique.	21
Fig. 7. Schéma général de la méthode de FISH	26
Fig. 8. Schéma représentant l'étape de préparation de la sonde.	27
Fig. 9. Schéma de la procédure de collecte d'embryons	28
Fig. 10. Étapes de détection de la sonde.	29
Fig. 11. Schéma récapitulatif du système UAS-Gal4.	31
Fig 12. The Centrocortin ( <i>cen</i> ) mRNA localizes dynamically to centrosomes and astral microtubules in the developing <i>Drosophila</i> embryo.	38
Fig 13. <i>Cen</i> and <i>ik2</i> mRNAs are co-localized to interphase centrosomes in <i>Drosophila</i> embryos.	39
Fig 14. Evolutionary conservation of <i>cen</i> and <i>ik2</i> localization within different <i>Drosophila</i> species.	41
Fig 15. Localization of <i>ik2</i> is dependent on a functional <i>Cen</i> gene.	43
Fig 16. The <i>cen</i> CDS is required for centrosomal targeting.	45
Fig 17. Modèle propose du mécanisme de localisation de <i>cen</i> et <i>ik2</i> aux centrosomes	53

# 1. Introduction

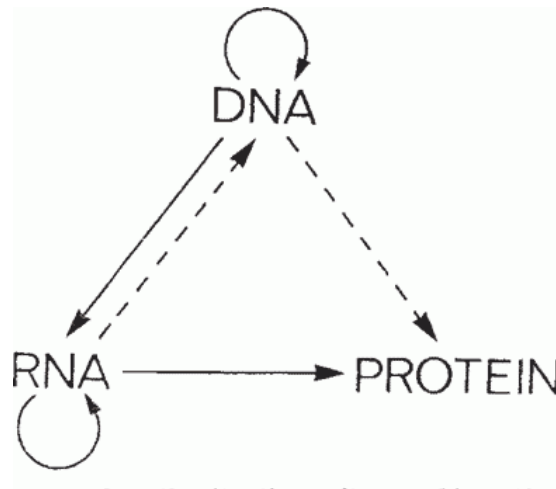
## *1.1 Régulation de l'expression génique*

Le dogme central de la biologie moléculaire a été formulé par Francis Crick dès 1958 (1). Il décrit le modèle d'utilisation de l'information génétique. L'ADN est une macromolécule biologique stable contenant l'information génique sous forme de bases azotées. L'ADN est transcrit en ARN. Cet ARN sert d'intermédiaire entre l'ADN et les protéines qui sont le produit des gènes encodés par la séquence d'ADN du génome de l'organisme. Ainsi, l'ADN peut se répliquer en molécule d'ADN identique (processus de réplication), être transcrit en ARN (processus de transcription) et cet ARN peut être traduit ou non en protéines (processus de traduction) (2) (Figure 1).

Cette vision du dogme suggère que les gènes encodent des protéines et que les protéines à elles seules sont responsables de l'expression du matériel génétique compris dans notre ADN. Cependant, il existe plusieurs procédés de régulation au niveau de l'ARN. Par exemple, l'ajout d'une queue poly-A permet la stabilisation des transcrits d'ARN présents dans la cellule. De plus l'épissage est un procédé lors duquel certaines parties d'ARN, appelées introns, sont retirées du transcrit d'ARN et ne seront pas traduites en protéine. De plus, des études plus récentes ont démontré que les molécules d'ARN elles-mêmes peuvent avoir des fonctions indépendantes de la protéine encodée. En effet, les ARN peuvent avoir certaines fonctions structurales ou même enzymatiques. Par exemple, un des ARN les plus étudiés dans



le domaine de la localisation des ARNm, oskar, agit comme protéine d'échafaudage lors de l'embryogenèse de la *Drosophila* (3)



**Fig 1. Représentation schématique du dogme central de la biologie moléculaire.**

### *1.2 Principes de l'organisation cellulaire*

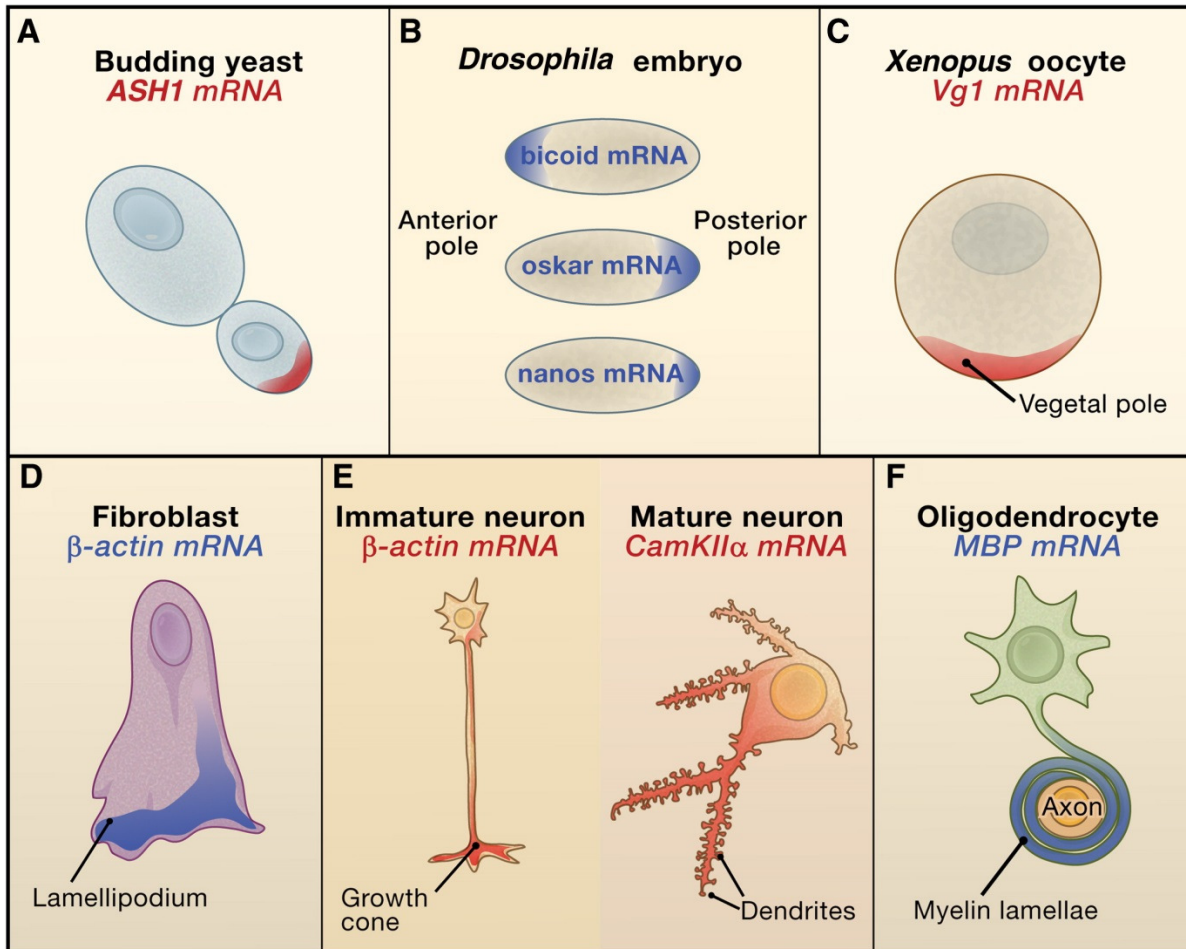
Le transport des macromolécules biologiques est extrêmement important pour la survie de la cellule. Les protéines sont ciblées dans la cellule à l'aide de séquences peptidiques retrouvées au cœur des protéines. La présence d'une telle séquence permettra le transport de la protéine à un endroit particulier. Presque toutes les protéines destinées à la voie de sécrétion contiennent une séquence de 5-30 acides aminés dans la région N-terminale. Ceci inclut les protéines résidant dans les différentes organelles (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondrie, etc.) et les protéines ciblées aux membranes biologiques (4). Parmi les exemples classiques de peptides cibles permettant de localiser une protéine, le signal de

localisation nucléaire (NLS) permet de localiser une protéine au noyau. Un tel peptide cible a été découvert d'abord chez la protéine SV40 Large T-antigen (5). De plus, une séquence de quatre peptides spécifiques, KDEL, permet la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (6). Il semble de plus en plus évident que la localisation directe des molécules d'ARN messagers (ARNm) pourraient servir d'alternative au ciblage protéique.

### *1.3 Avantage de la localisation des ARNm*

Bien que les mécanismes de localisation des protéines soient relativement bien connus, les molécules d'ARN elles-mêmes peuvent être transportées dans une cellule. La localisation des ARNm maternels a d'abord été observée dans les embryons de certains insectes comme *Oncopeltus fasciatus* et *Chaetopterus pergamentaceus* alors que certains transcrits, dont les transcrits d'histones et de l'actine, étaient subcellulairement localisés dans l'embryons très précoce de ces insectes (7). Une répartition bien ordonnée des molécules d'ARNm et des protéines permet de coordonner l'expression des gènes ainsi que bien d'autres procédés biologique vitaux. D'ailleurs, l'importance de la co-localisation des protéines avec d'autre biomolécules afin de réguler la signalisation cellulaire a été caractérisée par modélisation informatique. En effet, il a été démontré que si l'ARNm cible était dans un endroit aléatoire dans la cellule, par rapport au lieu de synthèse protéique, dans une cellule relativement grosse comme un embryon de *Drosophile*, la probabilité d'interaction entre ces molécules était faible (8). Il a été démontré que la localisation des ARNm était très importante afin de réguler divers procédés biologiques dans différents organismes, de la bactérie jusqu'à l'humain (8). Par exemple, chez la levure, il a été démontré que l'ARNm Ash1 est localisé au niveau du

bourgeon. La présence de Ash1 au niveau de la cellule-fille permet de contrôler le destin cellulaire de la cellule-mère et de la cellule-fille (9). La localisation de l'ARNm de la  $\beta$ -actine au niveau de lamellipodes dans les fibroblastes et au niveau des axones dans les neurones permet de réguler la migration cellulaire (10,11). La polymérisation des filaments d'actine étant nécessaire à la migration cellulaire, la traduction locale des transcrits d'actine aux lamellipodes rend la migration efficace. Il y a un important trafic d'ARNm dans les neurones. Quelques exemples incluent l'ARN CamKII, qui est localisé au niveau des dendrites et qui est important pour la plasticité synaptique et pour l'établissement de la mémoire à long terme (12). La localisation des ARNm est aussi très présente lors du développement embryonnaire de différents organismes. Chez le xénope, l'ARNm Vg1, qui encode pour un inducteur mésodermal, est localisé dans le pôle végétal de l'œuf (13). Chez la *Drosophile*, une collection d'ARN a été identifiée pour établir les axes embryonnaires dans l'embryon lors de l'embryogenèse précoce. L'ARN le plus classique qui a été caractérisé comme remplissant un tel rôle est l'ARNm *oskar*, dont le gène régule la formation et l'assemblage de la lignée germinale chez la *Drosophile*. L'ARN *oskar* doit se localiser au niveau du pôle postérieur embryonnaire, mais lorsqu'il est localisé au niveau antérieur, la lignée germinale est en fait induite au pôle antérieur. Ceci fut la première démonstration d'un rôle fonctionnel de la localisation des ARNm pour la régulation du développement embryonnaire chez la *Drosophile*. D'autres ARN se localisant aux pôles embryonnaires incluent *nanos*, localisé aussi au niveau du pôle postérieur (14) où se trouvent les cellules germinales et *bicoid*, qui se trouve plus au niveau antérieur (15). Ces exemples permettent d'apprécier la grande variété de procédés biologiques impliquant la localisation intracellulaire de transcrits d'ARNm (Figure 2).



**Fig 2. Exemples d'ARNm avec localisation particulière.** A. L'ARNm de ASH1 se localise à l'extrémité du bourgeon chez la levure. B. Chez l'embryon de la *Drosophila*, l'ARNm de bicoid se localise au niveau du pôle antérieur, tandis que oskar et nanos se localisent au pôle postérieur. C. L'ARNm de Vg1 se localise au niveau du pôle végétal dans l'oocyte de xénope. D. L'ARNm de la  $\beta$ -actine est situé dans les lamellipodes des fibroblastes. E. Dans le neurone immature, l'ARNm de la  $\beta$ -actine est localisé dans le cône de croissance des axones. Dans les neurones matures, l'ARNm de CamKII $\alpha$  est situé au niveau des dendrites. F. L'ARNm de MBP est retrouvé au niveau de la gaine de myéline dans les oligodendrocytes. Figure adaptée de la référence (16).

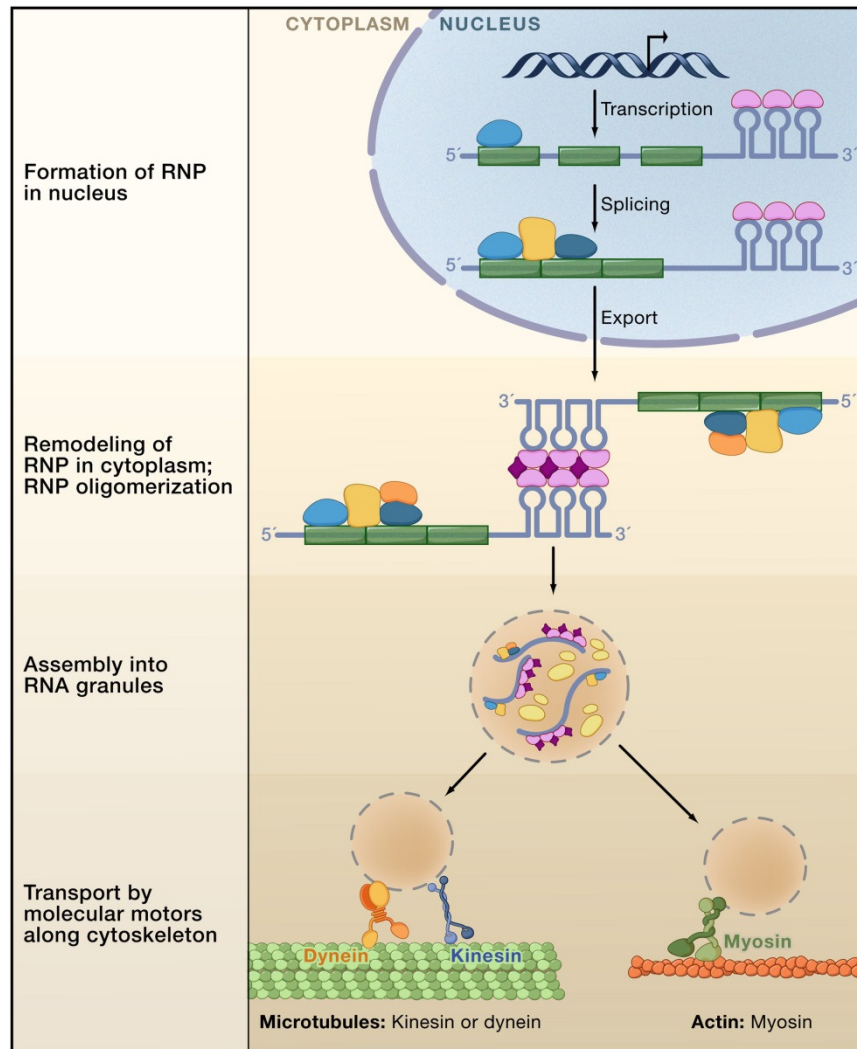
En plus de réguler ces procédés biologiques centraux, la localisation des ARNm comme telle peut apporter un bon nombre d'avantages intéressants à la cellule. La recherche faite par le passé a permis d'apprécier en détails la voie de sécrétion des protéines, procédé lors duquel l'ARNm est d'abord traduit en protéine, puis cette protéine est localisée en fonction d'un signal peptide contenu dans la séquence même d'acides aminés de la protéine. La localisation directe du transcrit comme alternative à cette voie pourrait être intéressante pour la cellule. Premièrement, ce mécanisme pourrait être énergétiquement favorable à la cellule. En effet, le transport de la molécule d'ARN pourrait permettre d'économiser de l'énergie en effectuant plusieurs rondes de traduction sur cet ARNm au lieu de transporter individuellement chaque protéine une fois synthétisée. Ainsi, le trafic global de macromolécules se retrouve diminué ce qui est intéressant au niveau énergétique. Comme il a été démontré que la localisation des transcrits corrèle fortement avec la distribution protéique (17), ceci pourrait être un des principaux bienfaits de la localisation des ARNm pour l'organisme. Deuxièmement, la traduction localisée du transcrit d'ARNm permet un enrichissement rapide de la protéine directement à l'endroit où elle est nécessaire dans la cellule. Ceci est extrêmement important dans la régulation de certains procédés biologiques comme la migration cellulaire (polymérisation rapide de l'actine au front cellulaire) (10, 11) et la plasticité synaptique (12). En troisième lieu, une fine régulation de la localisation des molécules d'ARNm et de leurs produits permet d'éviter que ces molécules se trouvent à des endroits non désirés où elles pourraient avoir un effet néfaste sur la cellule et l'organisme. Par exemple, les ARNm se trouvant aux pôles embryonnaires sont très importants pour établir les axes embryonnaires (14, 15), sans lesquels le développement d'un organisme en santé est impossible. Il est primordial que ces ARNm soient ancrés au bon endroit. Quatrièmement, les ARN peuvent

avoir une fonction non-codante (qui ne dépend pas de la protéine encodée). À titre d'exemple, la molécule d'ARN peut en effet agir comme une molécule d'échafaudage permettant la formation de complexes macromoléculaire au cœur de la cellule (18). En cinquième lieu, le procédé de localisation des ARNm permet de stocker certains ARNm et bloquer leur traduction sous certaines conditions. La rétention nucléaire a été démontrée comme étant essentielle pour la réponse au stress chez la souris. En effet, *cat2* est emmagasiné dans le noyau et transporté hors de celui-ci lors d'un stress cellulaire (19). Les avantages de la localisation des transcrits d'ARNm sont donc très intéressants et ce procédé pourrait être la norme et non l'exception.

#### *1.4 Mécanismes de localisation des ARNm*

D'une manière générale, le transport des molécules d'ARN a lieu via la reconnaissance d'un élément de régulation en *cis* (CRM), soit une séquence régulatrice retrouvée au cœur même de l'ARN, par un facteur de régulation en *trans*, soit un régulation extérieur, plus souvent une protéine (19). Les CRMs peuvent résider à n'importe quel endroit dans la molécule d'ARN, mais sont plus souvent retrouvés au niveau du 3'UTR du transcrit (20). Les facteurs de régulation en *trans* sont des protéines liant l'ARN (RBPs, RNA Binding Proteins). Bien que ce ne fût jamais caractérisé jusqu'à présent, il n'est pas impossible que ce facteur soit une autre molécule d'ARN, comme un long ARN non codant (lncRNA) ou un micro ARN (miRNA). La reconnaissance du CRM peut affecter directement le transport ou agir de manière plus subtile en influençant la stabilité du transcrit.

Le mécanisme général de transport des ARNm comprend quatre grandes étapes (Figure 3). La première étape est la formation de ribonucléoprotéines (RNPs) dans le noyau. Les RBP et autres facteurs importants pour la maturation et le transport du transcrit se lient sur l'ARN dans le nucléoplasme. La seconde étape est l'oligomérisation des RNPs dans le cytoplasme. Cette étape suit les étapes de transcription, épissage et export nucléaire et consiste en l'interaction entre les RNPs elles-mêmes via des interactions protéine-protéine. Il est possible que l'interaction soit entre deux molécules d'ARNm. La troisième étape est l'assemblage des RNPs en granules d'ARN, bien que cette étape ne soit pas universelle à tous les transcrits. Finalement, la dernière étape est le transport sur le cytosquelette à l'aide de moteurs moléculaires. La dynéine et la kinésine permet le transport sur les microtubules alors que la myosine permet le transport sur les filaments d'actine (16).



**Fig 3. Étapes générales du transport des ARNm.** La formation des RNPs dans le noyau est la première étape. Ensuite, les RNPs sont remodelées au niveau du cytoplasme et oligomérisent entre elles. Par la suite, il y a formation de granules d'ARN. Finalement, les granules sont transportés sur le cytosquelette par des moteurs moléculaires. Les exons sont représentés en vert et les introns ainsi que les régions non traduites en bleu clair. Les protéines sont représentées par les formes roses, violettes, orangées, bleues et jaunes. Figure adaptés de la référence (16).

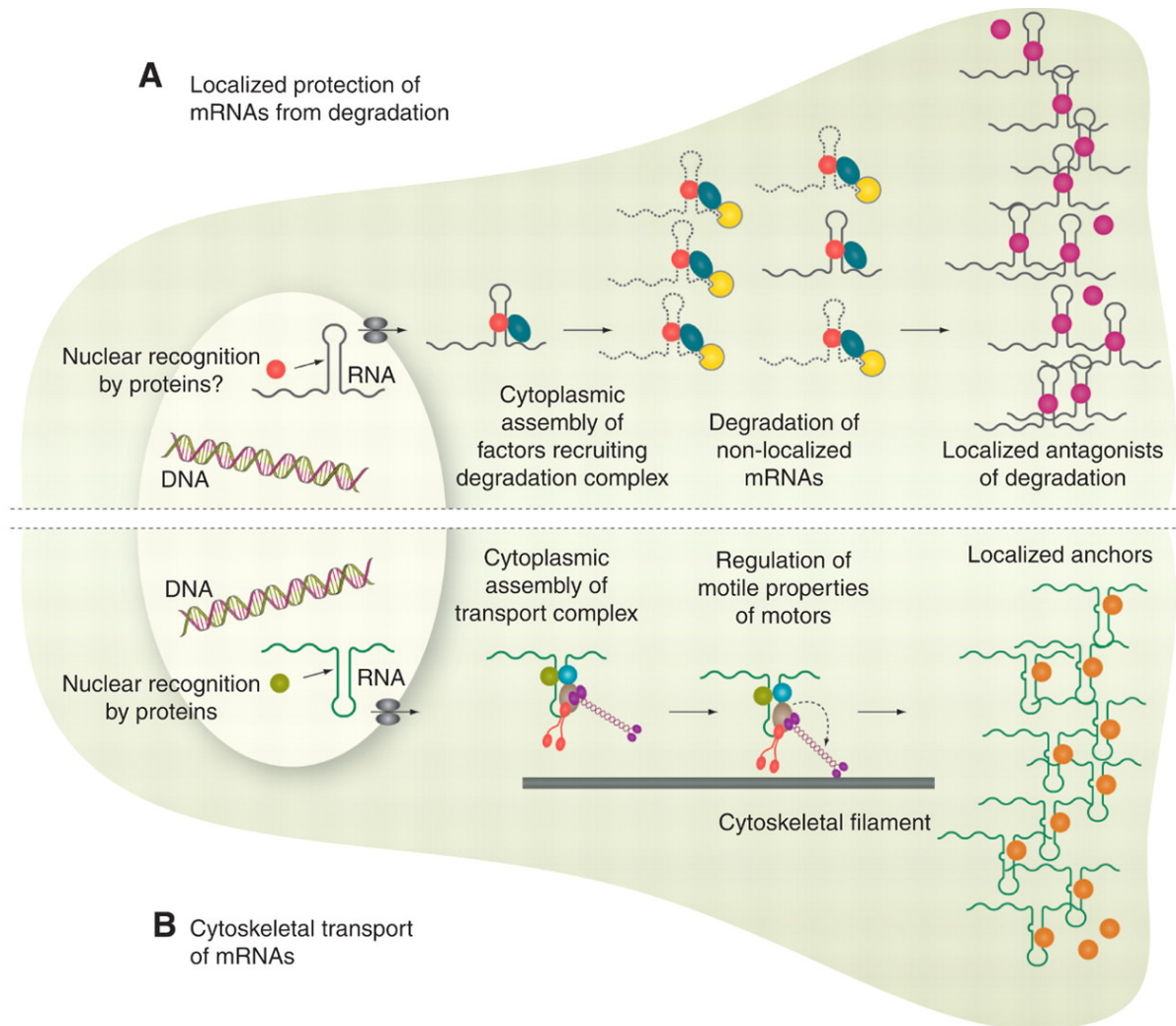


Les mécanismes qui ont été élucidés jusqu'à ce jour sont I) la diffusion simple ou dirigée de l'ARN et captation à un site spécifique (21), II) la protection ciblée du transcrit de la dégradation à un certain endroit dans la cellule (22) et III) le transport actif sur le cytosquelette (23-25). Certains sont illustrés en Figure 4.

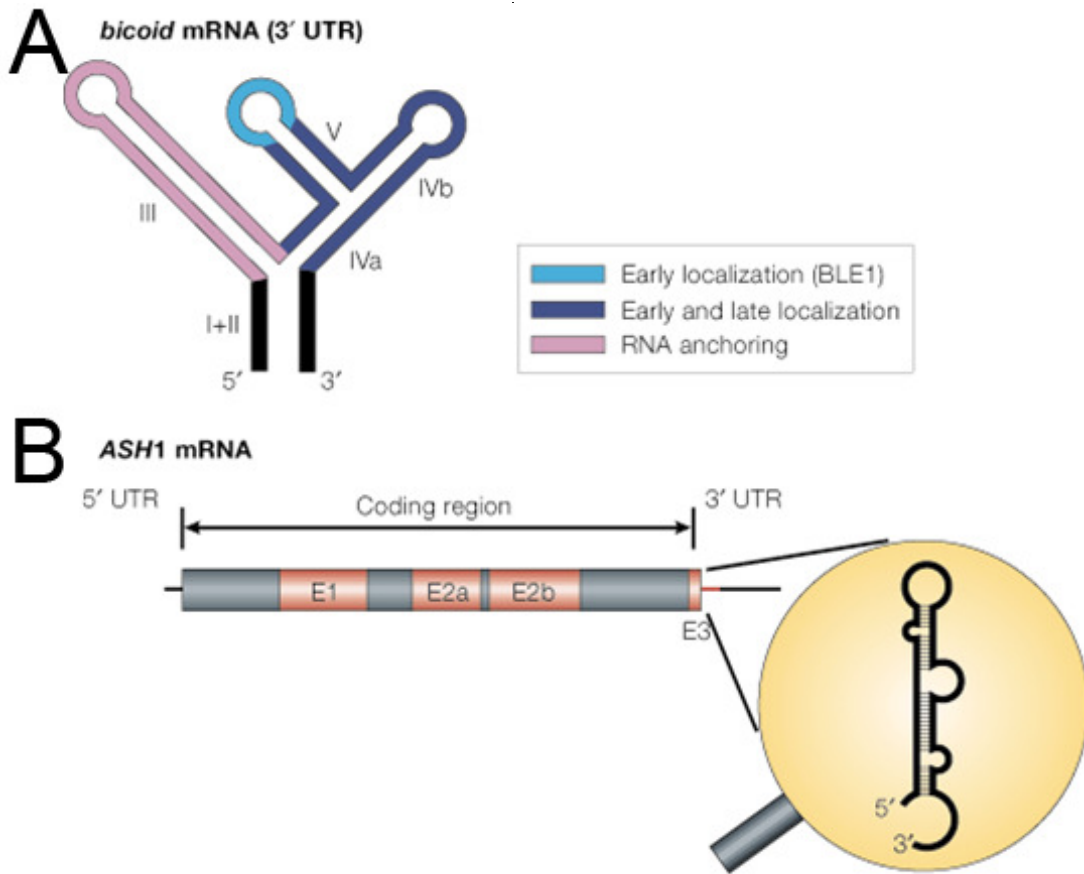
Certains facteurs ont déjà été identifiés comme étant des régulateurs de la localisation des ARNm. Dans le cas d'*Ash1*, il a été démontré que She2p et She3p peuvent interagir in vitro avec l'ARNm de *Ash1* (26). Une modèle dans lequel She2p et She3p interagissent en synergie en liant des éléments de localisation retrouvés dans la séquence de *ash1* (Figure 5) a été proposé. She3p sert d'adaptateur afin de lier Myo4p, un moteur moléculaire qui permet le transport du complexe macromoléculaire sur les filaments d'actine (27). Chez la *Drosophile*, Egalitarian (Egl) est une RBP qui reconnaît un élément de localisation double-brin retrouvé chez les ARN localisés apicalement (28). Bicaudal D (BicD) agit comme protéine adaptatrice permettant un lien entre l'ARN et la dynéine, un moteur moléculaire permettant le transport sur les microtubules, en se liant à Egalitarian (Egl). BicD a aussi été identifiée comme un régulateur de FMRP, une RBP impliquée dans le transport des ARNm dans les neurones et dans la traduction locale de ces transcrits (29).

Les éléments de localisation sont des séquences primaires ou des structures secondaires. L'élément de localisation de *bicoid*, BLE est situé au niveau du 3'UTR et a été identifié en effectuant des troncations dans ce 3'UTR afin de déterminer les régions nécessaires à la localisation de ce transcrit (Figure 5) (30). Ces éléments en forme de tige-boucle permettent la dimérisation des molécules d'ARN de *bicoid*, ce qui mènera à leur localisation médiée par

Staufen (31). L'ARNm de la  $\beta$ -actine contient un élément de localisation appelé le 'zip-code' (32). Le zip-code consiste en deux éléments : un élément situé en 3' dont la séquence consensus est C/A-CA-C/U ainsi qu'un élément en 5' dont la séquence consensus est CGGAC (33). Des expériences de gel-shift et de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier ZBP-1 comme régulateur de la localisation de la  $\beta$ -actine (34). Le domaine KH3 de ZBP-1 lie l'élément 3' et le domaine KH4 lie l'élément 5'. Ces deux domaines sont situés dans la partie C-terminale de ZBP-1 (34). Les exemples d'éléments de localisation sont nombreux. Une base de données contenant les interactions entre différents motifs d'ARN et des RBPs connues ou prédites a été récemment construite en utilisant une approche d'essais de liaison de RBPs sur différents motifs *in vitro* en utilisant des micropuces (35).



**Fig 4. Mécanismes caractérisés de localisation des ARNm.** A. Protection localisée des transcrits. Une fois le complexe de RNPs assemblé dans le cytoplasme, la machinerie de dégradation des ARNm est recruté à ce complexe pour dégrader le transcrit. Ce transcrit ne sera pas dégradé s'il est localisé correctement. À cet endroit, il sera protégé par un antagoniste de dégradation. B. Transport actif sur le cytosquelette. Une fois le complexe de RNPs assemblé dans le cytoplasme, l'ARNm est transporté sur le cytosquelette est en ancré à son endroit final par des facteurs protéiques. Figure adaptée de la référence (36).



**Fig 5. Exemples d'éléments de localisation identifiés dans certains transcrits.** A. Structure secondaire de *bcd* localization element (BLE) impliqué dans la localisation de *bicoid*. L'élément contient trois tige-boucles et cinq domaines. B. L'élément de localisation de *Ash1* contient des séquences dans la région codante (E1, E2a, E2b) ainsi que dans la région 3'UTR. L'élément E3 forme une structure secondaire contenant des tige-boucles. Figure adaptée de la référence (37).

### 1.5 Prévalence de la localisation des ARNm

La localisation des ARNm est un mécanisme qui à la base semblait plutôt rare. En effet, les premiers cribles par hybridation in situ effectués chez la *Drosophile* indiquaient qu'environ 1% à 10% des transcrits étaient localisés (38,39). Une première étude d'hybridation in situ utilisant l'oocyte de *Drosophile* comme modèle a permis d'identifier une vingtaine de transcrits montrant une localisation particulière dans l'ovocyte, mis à part les ARN classiques ayant déjà été caractérisés comme oskar et gurken (39). Une étude suivante, dans laquelle environ 2000 gènes ont été testés dans l'embryon de *Drosophile*, permettait d'estimer qu'environ 1% des transcrits étaient localisés, même si 63% des transcrits avait un profil d'expression dynamique au cours du développement (38).

Lors d'un crible à haut débit par hybridation in situ de fluorescence (FISH) afin d'identifier les patrons de localisation des ARNm durant l'embryogenèse de la *Drosophile*, il a été montré que >70% des ARNm sont subcellulairement localisés durant le développement embryonnaire de la mouche, montrant que la localisation des ARNm n'est pas l'exception, mais bien la règle (17). Les transcrits identifiés montraient des patrons de localisation divers et spectaculaires. Par exemple, certains transcrits sont localisés au niveau des jonctions cellulaires, d'autres sont associés à la chromatine, etc. Une corrélation significative a été observée entre la localisation des ARNm ainsi que la distribution et la fonction des protéines pour lesquelles ces transcrits encodent, ce qui suggère un rôle primordial dans l'assemblage et la régulation de l'architecture cellulaire. Cette étude a permis d'établir un lien entre la localisation des ARNm et l'organisation cellulaire dans un organisme entier.

D'autres cribles génomiques plus récents ont ciblé des aspects plus spécifiques de la localisation des ARNm. Par exemple, une étude a permis d'identifier les ARNm localisés dans les protrusions cellulaires et qui pourraient être impliqués dans la migration cellulaire chez les fibroblastes (40). En utilisant une approche de microarray, les ARNm localisés dans les protrusions ont été identifiés. De plus, les ARNm interagissaient avec le suppresseur de tumeur adénomateux polyposis coli (APC) et avec FMRP, identifiant ainsi APC comme un nouveau régulateur de la localisation des ARNm dans les protrusions cellulaires.

Le système nerveux est un des systèmes biologiques dont la localisation des ARNm s'y retrouvant a été le plus caractérisé. En effet, la première évidence que la localisation des protéines dans la cellule pouvait découler de la localisation de son transcrite d'ARNm fut la caractérisation de la localisation de l'ARNm de Myelin base protein (MBP) dans les oligodendrocytes. La protéine MBP est nécessaire au maintien de la gaine de myéline dans les circuits neuronaux (41, 42). L'observation de l'enrichissement l'ARNm de MBP dans la myéline purifiée (43) a été l'élément déclencheur qui a permis de prouver par la suite qu'une molécule ARNm était capable de se localiser dans une cellule par elle-même. Une expérience d'hybridation *in situ* sur des cerveaux de souris en développement a permis de montrer *in vivo* que cet ARNm est exprimé dans le corps cellulaire des oligodendrocytes (44).

### *1.6 Localisation des ARNm au niveau de l'appareil mitotique*

Il y a une soixantaine d'années, des fuseaux mitotiques ont été extraits de l'oursin de mer (45). Des analyses d'extraits de fuseaux a permis de découvrir la présence de ribosomes hautement concentrés sur le fuseau (46). Des observations par microscopie électronique ont par la suite permis de détecter concrètement ces ribosomes associés au fuseau mitotique (47). Ce phénomène est observable dans plusieurs types cellulaires.

Une quarantaine de transcrits localisant à divers composants de la machinerie mitotique (microtubules, kinétochores, centrosomes, etc.) ont été identifiés chez *D. melanogaster* (Tableau 1). La plupart de ces transcrits encodent des régulateurs connus de la mitose.

Tableau 1. Liste des ARNm localisés au niveau de l'appareil mitotique.

Localisation de l'ARNm	Gène	Fonction
Microtubules/Centrosomes	BicD	Transport de l'ARN (via dynéine)
"	Bsg25D	Nucléation des microtubules
"	BubR1	Organisation du fuseau mitotique
"	CycB	Régulation du cycle cellulaire
"	CG14897	Inconnue
"	Cen	Organisation du sillon mitotique
"	CG9977	Inconnue
"	CP309	Nucléation des microtubules
"	Dm	Facteur de transcription
"	Dok	Lie récepteur de l'insuline
"	Ens/E-MAP-115	Recrutement de la kinésine aux microtubules
"	IK2	Kinase/Organisation des filaments d'actine
"	Grip91/l(1)dd4	Lie les microtubules et les centrosomes
"	Pins	Orientation du fuseau mitotique
"	Stwl	Facteur de transcription
Fuseau mitotique	CG14408	Inconnue
"	CG15634	Inconnue
"	CG5077	Inconnue
"	CG6045	Inconnue
"	Hrg	PolyA polymérase
"	Kuk	Organisation de la membrane nucléaire
"	Nullo	Cytocinèse
"	Odd	Répresseur transcriptionnel
"	Ptr	Inconnue
"	Rib	Facteur de transcription
"	Run	Facteur de transcription
"	Sry-alpha	Cytocinèse/Organisation des filaments d'actine
Centrioles	CG14438	Inconnue
"	Trio	Rho GEF/Organisation des filaments d'actine
Autres composants	Ady43A	Activité adénosine kinase
"	CG8654	Inconnue
"	Wech	Adhésion cellulaire
"	Anillin	Cytocinèse
"	Taf4	Facteur de transcription



Des études sur d'autres organismes modèles ont aussi permis d'identifier une collection de transcrits enrichis dans certaines composantes de la machinerie mitotique. Un crible par microarray a permis d'identifier des ARNm interagissant avec les microtubules chez le xénope (48). En utilisant une approche par purification des ARN associés aux microtubules, il a été démontré qu'environ 5% des transcrits sont enrichis aux microtubules. Ces résultats ont été répliqués avec une lignée cellulaire humaine (HeLa), alors que 10% des transcrits montraient un enrichissement important aux microtubules. Une analyse par microarray a permis d'identifier la nature des transcrits. En répétant l'analyse suite à une purification des ARNm associés au polysomes, il a été montré que la traduction active n'était pas nécessaire à la présence des transcrits aux microtubules (48).

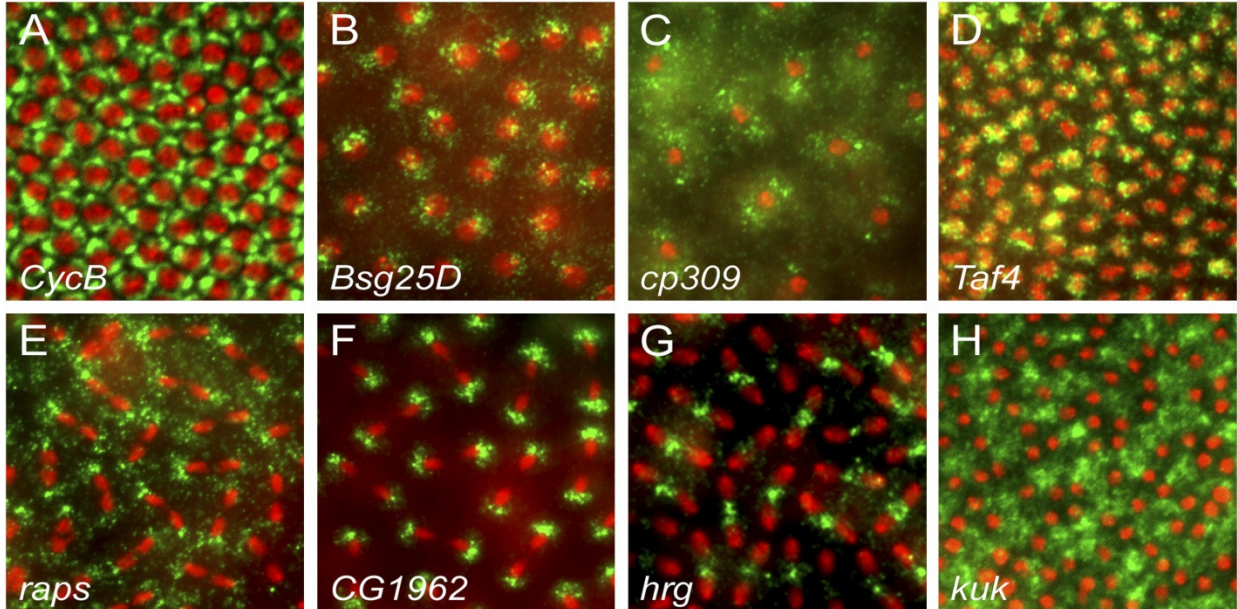
La localisation des transcrits au niveau de l'appareil mitotique peut remplir différentes fonctions. Premièrement, une distribution symétrique ou asymétrique des molécules d'ARN dans une cellule en division permet de réguler la division cellulaire en régulant le contenu en ARN de la cellule mère et la cellule fille. Une division asymétrique peut survenir lorsque l'ARN est distribué de manière non symétrique entre les deux pôles du fuseau mitotique. La localisation des ARNm pourrait être un mécanisme permettant de s'assurer que le contenu en ARN aux deux pôles soit identique. Ce phénomène a été observé chez le mollusque *I. obsoleta*, dans lequel des populations d'ARNm différentes présentes sur les centrosomes en interphase permettaient de définir le destin cellulaire (49). Chez la *Drosophile*, il a été observé que certains ARNm de Prospero, localisés au cortex cellulaire permettaient la production des neuroblastes par sa localisation asymétrique dans la cellule fille (50).

Deuxièmement, la localisation des ARNm peut permettre de réguler la division cellulaire. Comme plusieurs ARN qui sont localisés au niveau de l'appareil de mitose sont des régulateurs connus de ce procédé, il est possible d'imaginer que la traduction locale de ces transcrits peut enrichir la concentration protéique de facteurs importants pour réguler la mitose à différentes étapes. Certains ARNm particuliers ont, par ailleurs, été caractérisés comme ayant un rôle primordial pour la mitose. Par exemple, il a été montré que la traduction locale de la cycline B1 au niveau du fuseau mitotique est vitale à la division cellulaire (51). De plus, l'activation de la transcription localisée au niveau de l'appareil mitotique pour des régulateurs de la ségrégation des chromosomes et de l'assemblage du fuseau mitotique est requise pour la première division méiotique ainsi que pour la ségrégation des chromosomes chez *X. laevis* (52). Enfin, les centrioles contiennent de l'ARN qui est nécessaire à la formation des asters (53, 54).

Troisièmement, ces molécules pourraient avoir des fonctions non-codantes, qui ne dépendent pas de la protéine encodée par le transcrit. Par exemple, ces molécules d'ARN pourraient jouer un rôle de molécules d'échafaudage (scaffolding). Certains exemples d'ARNm localisés au niveau de l'appareil mitotiques sont montrés dans la figure 6.

La purification et le séquençage des ARNm associés aux microtubules ont été réalisées chez *Xenopus tropicalis*. Il a été montré qu'environ 450 transcrits étaient localisés aux microtubules dans les œufs de *X. tropicalis* (55). De plus, il a été démontré à l'aide d'une série d'expériences d'interférence aux ARN a permis de montrer que ces transcrits avaient un rôle dans la division cellulaire puisque leur délétion par interférence aux ARN menait à des

troubles d'établissement des pôles lors de la métaphase. Ainsi, l'interaction entre les microtubules et certains transcrits joue un rôle vital dans la régulation de la division cellulaire lors de l'embryogenèse chez le Xénope.



**Fig 6. Certains ARNm sont enrichis au niveau de l'appareil mitotique.** Marquage par hybridation in situ de fluorescence montrant la localisation d'ARNm (vert) au niveau de l'appareil mitotique dans l'embryon précoce de la *Drosophile*. Rouge = DAPI (noyaux).

Centrocortin (Cen, CG1962) est une protéine ayant été identifiée comme interagissant avec la Centrosomin (CNN), une protéine de matériel péricentriolaire, afin de réguler la formation du sillon mitotique dans l'embryon de *Drosophile* (56). La formation de ce sillon est un processus régulé par les centrosomes (57-59). Il a été démontré qu'une perte de fonction de Cen chez la *Drosophile* menait à des défauts sévères de division cellulaire dans l'embryon précoce. Des défauts de fusion du fuseau mitotique sont observés, la formation de fuseaux multipolaires est également visible (56). L'importance de la fonction de Cen au niveau des centrosomes est donc primordiale pour un développement embryonnaire correct.

Fait intéressant, l'ARNm de Cen a été identifié dans le crible du Dr Éric Lécuyer comme un ARNm se localisant aux centrosomes durant le développement embryonnaire de la *Drosophila*. Dans ce même crible, un second ARNm a été identifié comme ayant un patron de localisation très similaire à Cen. Cet ARNm est celui de IKB Kinase-like 2 (Ik2). Ik2 est une kinase de la famille des I Kappa B, qui régulent l'activité des facteurs de transcription Rel/NF-Kappa B. Des études ont démontré que la fonction de Ik2 est nécessaire à la localisation correcte des transcrits gurken et oskar dans l'ovocyte (60). Cette fonction est indépendante de NF-KappaB. Les embryons dans lesquels Ik2 n'est pas actif ont des défauts d'établissement des axes embryonnaires, les embryons sont bicaudaux et ventralisés. Ik2 a donc un rôle dans la localisation des ARNm lors du développement mais ne semble pas avoir de fonction au niveau des centrosomes.

Une analyse du locus de Cen chez *Drosophila melanogaster* a montré que Cen et Ik2 sont situés sur le même locus sur le chromosome 2L et qu'ils sont placés en conformation queue-à-queue, c'est-à-dire que leur 3'UTR respectif est superposé sur les deux brins d'ADN sur ce chromosome.

### *1.7 Transcrits anti-sens naturels (cis-NATs)*

Le génome de la *Drosophila* comme tout génome contient des sections qui sont transcrites dans les deux directions. Des études effectuées chez la plante ont montré que les transcrits anti-sens naturels (cis-NATs) menaient à la formation de petits ARN interférents (siRNA) importants pour la réponse au stress (61-62). Il y a 729 paires de gènes qui montrent une superposition sur les deux brins d'ADN chez *Drosophila melanogaster*. Une étude à l'échelle

génomique chez la *Drosophila* a montré que plus d'une centaine de siRNA endogènes étaient générés par transcription bidirectionnelle sur les deux brins de l'ADN du génome. La plupart de ces siRNA étaient issus de la transcription de gènes ayant une superposition au niveau de leur extrémité 3' (63). Contrairement à la plante, aucune évidence scientifique ne suggère un rôle précis de ces petits ARN chez les animaux dans la réponse au stress ou à des changements physiologiques jusqu'à ce jour. Cependant, il n'est pas impossible que la génération de petits ARN par transcription bidirectionnelle soit importante dans le maintien de l'homéostasie chez les animaux, car ce champ de recherche est relativement nouveau.

## 2. Hypothèse et objectifs du projet de recherche

L'**objectif général** de ce projet est de caractériser le mécanisme moléculaire permettant le ciblage des ARNm *cen* et *ik2* et l'importance fonctionnelle de la localisation des ARNm au niveau de l'appareil mitotique. **Mon hypothèse de travail est que la position des gènes dans le génome peut influencer les événements de localisation des ARNm dans le cytoplasme.**

Afin de tester cette hypothèse, ce projet a comme objectif de **définir les éléments de régulation en cis menant à la localisation de *cen* et *ik2***. Afin de réaliser ces objectifs, je propose les approches suivantes :

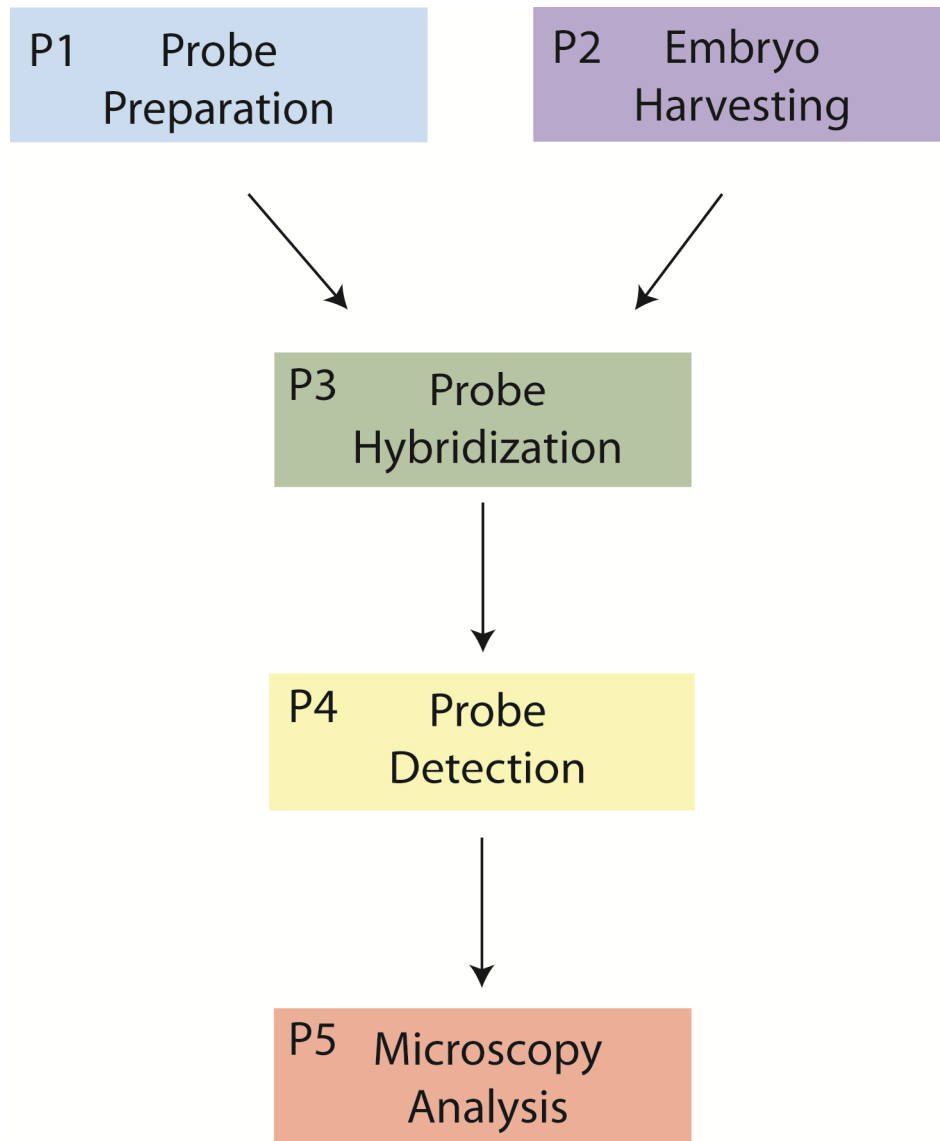
- 1) Tester la localisation de *cen* et *ik2* dans les mutants *Cen* et des embryons *Ik2* RNAi.
- 2) Tester la localisation de *cen* et *ik2* chez différentes espèces de *Drosophila* dans lesquelles le locus de *Cen/ik2* est différent.
- 3) Génération et analyse par FISH de mouches transgéniques comportant un rapporteur GFP.

## **Matériel et méthodes**

### **Hybridation in situ de fluorescence (FISH)**

La procédure d'hybridation in situ de fluorescence que j'ai utilisée permet de marquer les molécules d'ARN in vivo dans des tissus fixés. Elle a été optimisée chez les embryons de *Drosophila* et c'est la même méthode qui a été utilisée pour effectuer le criblage à haut débit afin d'identifier les patrons de localisation des ARNm chez l'embryon de *Drosophila* (17).

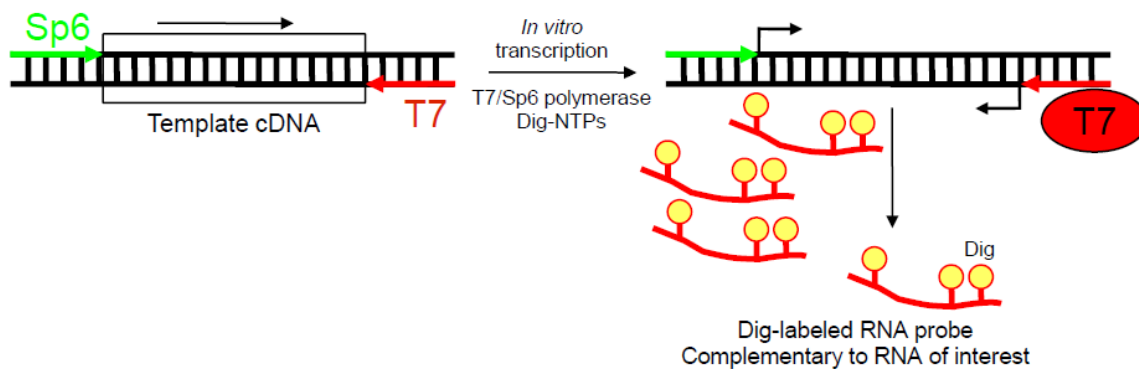




**Fig. 7. Schéma général de la méthode de FISH.** La méthode comprend cinq étapes : La préparation de la sonde, la collecte des embryons, le traitement des embryons, la détection de la sonde et l'analyse au microscope.

### Préparation de la sonde

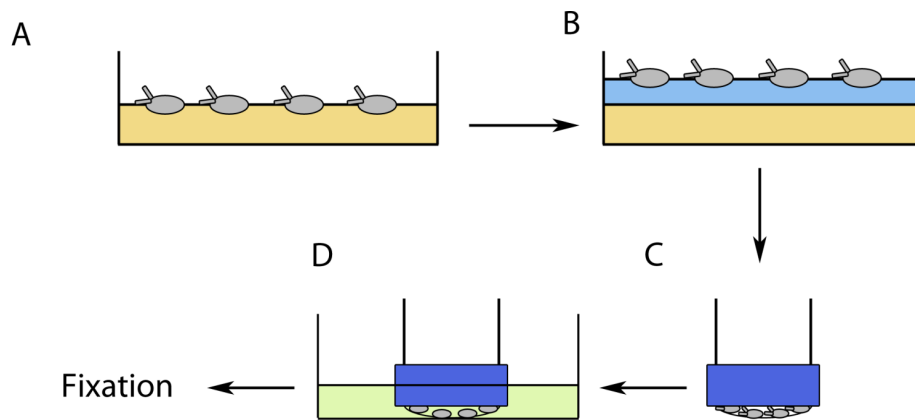
La collection de cDNA Drosophila Gene Collection a été utilisée afin de préparer les sondes. Cette librairie permet de purifier des vecteurs contenant des cassettes flanquées de promoteurs d'ARN polymérase de bactériophage : T3, T7 ou SP6. Le fragment peut être amplifié par PCR. Une réaction de transcription *in vitro* avec des ribonucléotides marqués à la digoxigénine (DIG) permet de générer un fragment d'ARN simple brin complémentaire à l'ARN d'intérêt dont le signal peut être amplifié avec un kit de détection TSA (tyramide signal amplification).



**Fig. 8. Schéma représentant l'étape de préparation de la sonde.** L'ADN matrice double-brin noir est flanqué de sites promoteurs pour les polymérases de bactériophage T7 et Sp6, puis une transcription *in vitro* est effectuée avec Dig-NTPs pour obtenir la sonde simple-brin (rouge).

## Collecte des embryons

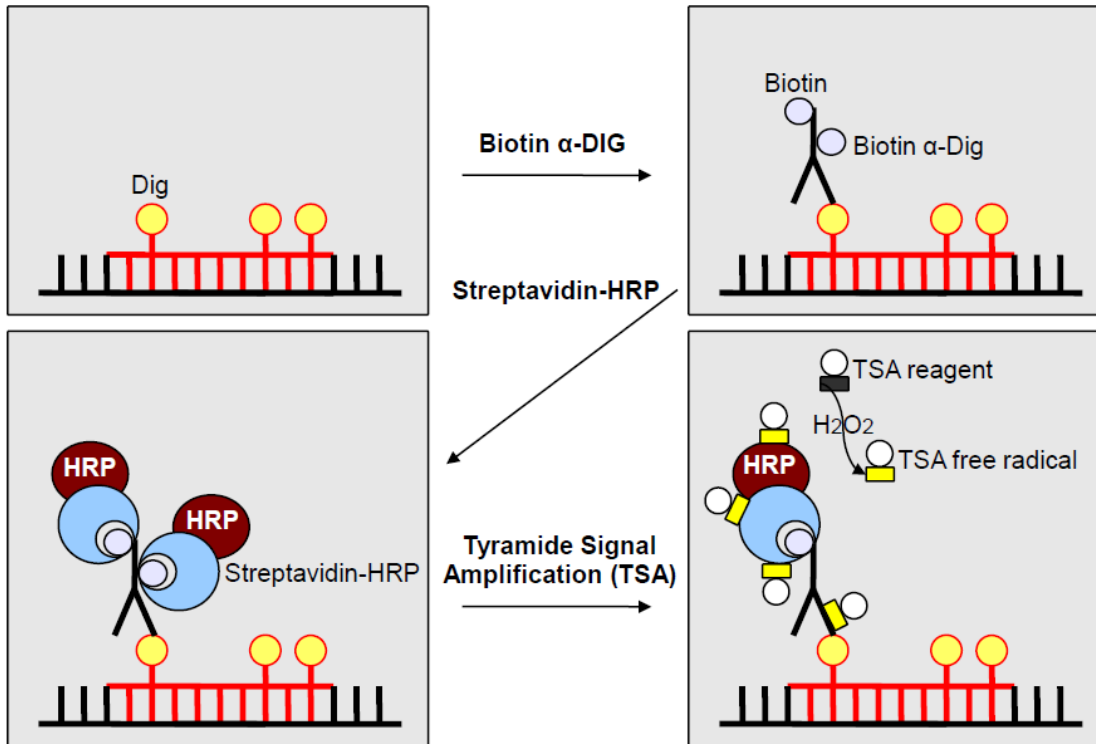
Voici un schéma expliquant les étapes de la collection des embryons :



**Fig. 9. Schéma de la procédure de collecte d'embryons.** A. Les mouches sont placées dans un pondeur qui contient un plat de pétri, sur laquelle a été rajouté de la levure, qui servira à récolter les embryons pondus par les mouches. B. Les embryons sont récoltés avec un pinceau et de l'eau à température ambiante. C. Les embryons sont placés dans des paniers et D. sont déchorionés pendant 90 secondes dans une solution d'hydrochlorate de sodium 3%. Les embryons sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes sont agitation et sont lavés 3 fois avec du méthanol. Les embryons fixés peuvent être conservés à -20C.

## Hybridation et détection de la sonde

Voici un schéma expliquant les étapes de détection de la sonde.



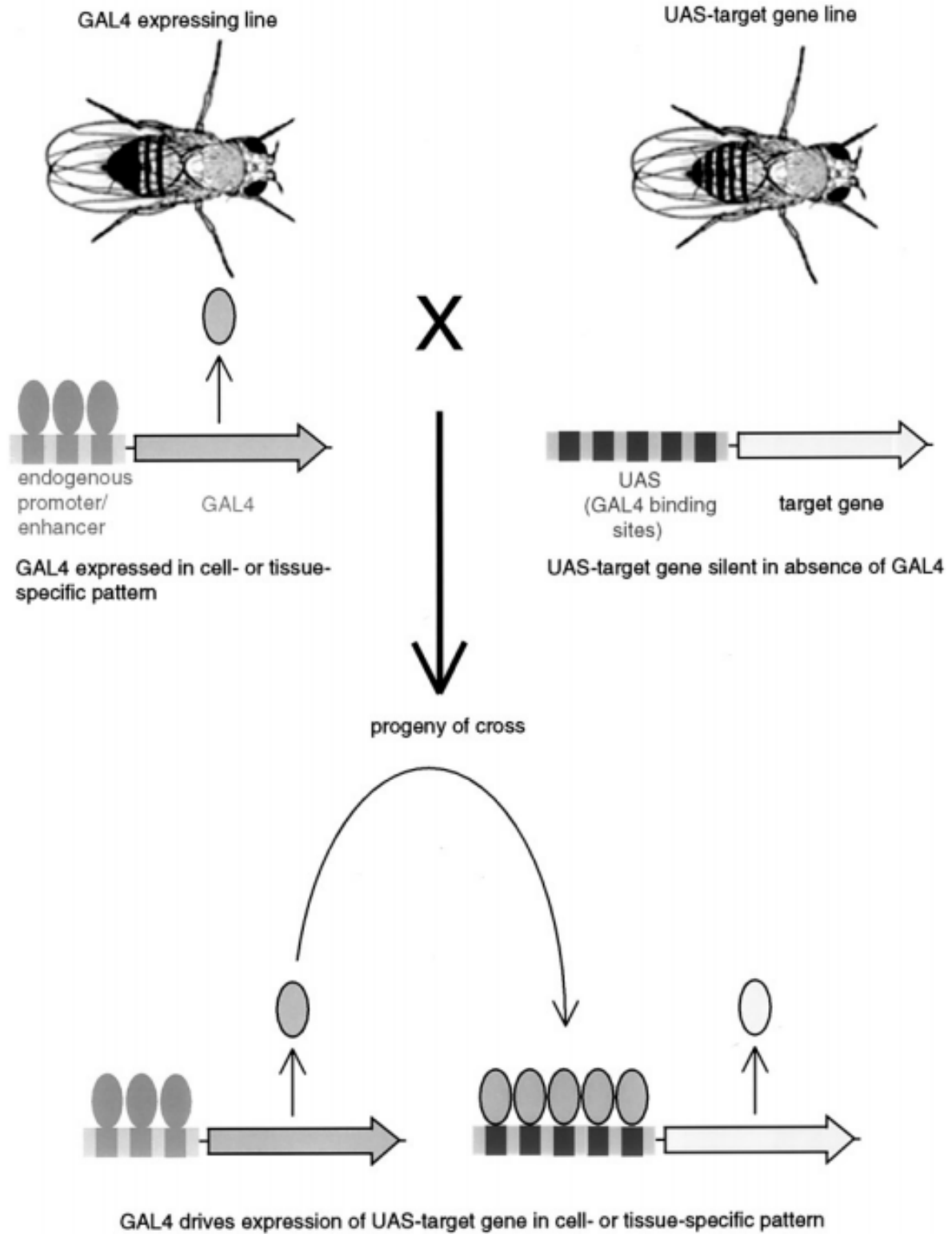
**Fig. 10. Étapes de détection de la sonde.** La sonde est hybridée à 56C pour 12-16h. Les embryons sont ensuite exposés à un anticorps anti-DIG couplé à la biotine qui se couple à la sonde qui est hybridée sur l'ARN d'intérêt. Ensuite, les embryons sont traités avec la streptavidine-HRP. La streptavidine permet de lier la biotine présente dans l'échantillon. Le kit de TSA permet d'effectuer une réaction qui permettra la formation de radicaux libre à partir de la tyramide, le réactif utilisé dans ce kit. Les radicaux libres se lient de façon covalente aux protéines environnantes, ce qui prévient leur diffusion loin de l'endroit auquel la sonde se trouve. La tyramide étant couplée à un fluorophore, un signal fluorescent peut être détecté au microscope.

### Analyse microscopique

Les échantillons sont analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM5500B. Les images utilisées ont été converties en fichier TIFF à haute résolution.

### **Transgénèse dirigée à l'aide du système UAS-Gal4**

Le système UAS Gal-4 est un système inductible dans lequel on peut insérer une séquence d'ADN à un endroit précis dans le génome de la *Drosophile*. Les vecteurs UAS contiennent une séquence promotrice, le UAS, qui est reconnue par Gal4, un facteur de transcription de la levure. Afin d'avoir l'expression du transgène, il faut croiser des mouches contenant le transgène à une lignée conductrice qui exprimera Gal4 à un moment précis du développement. Ceci provoquera l'activation de l'expression du transgène.



**Fig. 11. Schéma récapitulatif du système UAS-Gal4.** La lignée directrice contenant la séquence de Gal4 (expressing line) sous l'influence d'un promoteur choisi est croisée à des mouches transgéniques qui contiennent le transgène d'intérêt (target gene) sous contrôle du promoteur UAS. Gal4 sera donc produite lors de la génération suivante et l'expression du transgène pourra être activée *in vivo* suite à sa liaison au promoteur UAS. Figure adaptée de la référence (64).

La génération de mouches transgéniques se fait par microinjection du vecteur pUASP contenant le transgène dans des embryons précoces provenant d'une lignée réceptrice qui contient un site de recombinaison permettant l'insertion de la séquence ciblée à un endroit précis du génome. Les mouches recombinantes sont ensuite croisées à des lignées contenant des chromosomes balanciers afin de pouvoir les conserver comme toute autre lignée.

### 3. Présentation du manuscrit

## **Centrocartin and IKB Kinase-Like 2 mRNA localization to centrosomes during *Drosophila* embryonic development: how genome structure can influence mRNA localization.**

Short: How genome structure can affect mRNA localization.

**Félix Legendre<sup>1,2</sup>, Julie Bergalet<sup>1</sup>, Carole Iampietro<sup>1</sup>, Olivia Zhang<sup>1</sup> and Eric Lécuyer<sup>1,2,3</sup>**

1. RNA Biology Laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada.
2. Department of Biochemistry, University of Montreal, Montréal, Canada.
3. Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Canada.

#### **Keywords:**

1. RNA localization
2. Centrosomes
3. Fluorescent in situ hybridization
4. Embryogenesis



## ABSTRACT

Messenger RNA (mRNA) localization plays a key role in establishing cellular architecture and function. The *centrocortin* (*cen*) and *IκB Kinase-like 2* (*ik2*) mRNAs are co-localized to centrosomes in embryonic epithelial cells. Interestingly, both of these genes are organized in a head-to-head configuration in the genome, with their 3' untranslated regions (3'UTRs) overlapping on opposite DNA strands. Here we show that gene positioning of *cen* and *ik2* is important for the co-localization of these transcripts during *Drosophila* embryogenesis. Comparative Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) studies with different *Drosophila* species show that *cen* localization is conserved within the *Drosophila* phylogeny and that *ik2* cannot localize when it is separated from the *cen* locus. Also, loss of function mutants of *cen* show a complete loss of *ik2* localization, proposing that *cen* is the main driver of the co-localization. Structure-function analysis revealed that the coding region of *cen* is necessary for its centrosomal targeting, suggesting that a *cis*-regulatory motif that drives its localization is located in the coding region. This study reveals for the first time the importance of gene positioning for RNA localization. We suggest a model where *cen* mRNA is the main driver of centrosomal localization, which may occur through post-transcriptional interaction/annealing of these mRNAs via their 3'UTRs.

#### 4.1 INTRODUCTION

Cis-Natural antisense transcripts (cis-NATs) are transcripts derived from genomic regions in which transcription occurs on both strands. They are quite prevalent in eukaryotic genomes (65-67). It has been proposed that these transcripts can lead to the formation of double stranded RNAs (dsRNAs) (68). There are 729 pair of genes that overlap at the 3' end in the *Drosophila melanogaster* genome. The presence of overlapping transcription units has been shown to be implicated in temporal regulation of gene expression in the mouse polyomavirus (69) and to be implicated in stress response in plants (61-62). Some antisense messenger RNAs (mRNAs) have been reported to be subcellularly localized. Some of them are found in the cytoplasm like sense RNAs, but some of them have been shown to be associated with chromatin and the mitochondria (70).

The most studied pair of cis-NATs is the XIST and TSIX pair in which the transcription of the antisense RNA plays a key role in regulating gene expression on the X chromosomes of females (71). Antisense transcription is also involved in mRNA stability. It can improve mRNA stability by masking miRNA binding sites (72) or impair it by degrading double stranded RNA molecules that result from mRNA annealing of sense and antisense transcripts (73).

mRNA localization plays an important role in establishing cellular architecture and in controlling protein localization in living cells (17). Localization of mRNAs is mediated by RNA binding proteins (RBPs) that recognize *cis*-regulatory motifs (CRMs), which often reside in the 3' untranslated region (3'UTR) of transcripts. A genome-wide screen for mRNA

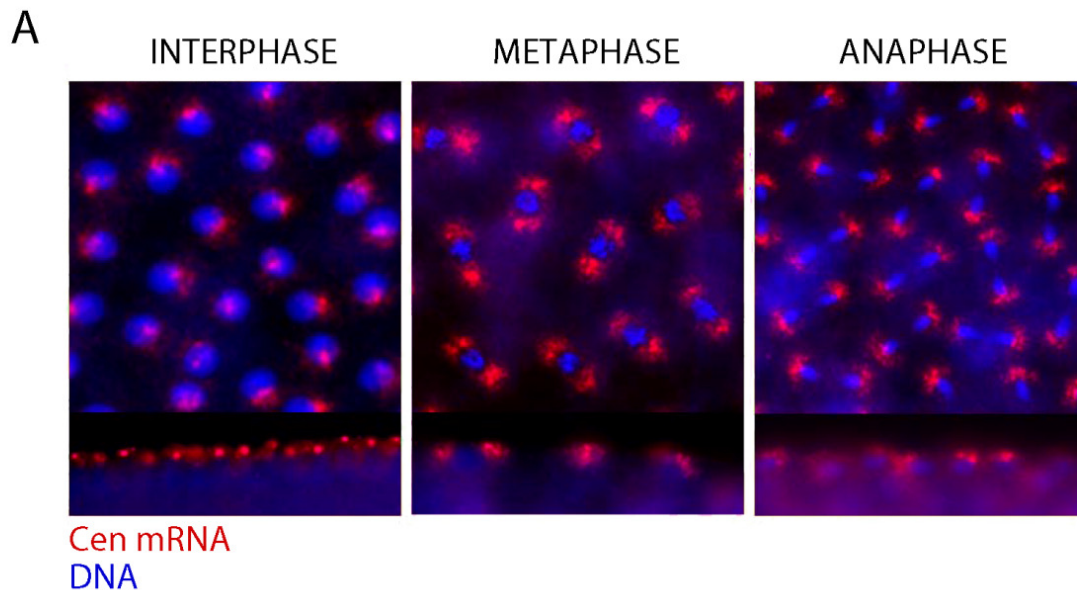
localization in *Drosophila melanogaster* developing embryos showed that 70% of mRNAs were subcellularly localized in a fashion that highly correlates with protein distribution (17). In that screen, there was a subset of RNAs that were found to be localizing to the cell division machinery. Among the 3370 genes studied, 33 were found to localize to the mitotic apparatus and 6 were localizing to centrosomes. Interestingly, most of these RNAs are encoding known regulators of cell division. Examples of these include cp309, which is required for microtubule nucleation in *Drosophila* embryos (74) and CycB, a cell cycle regulator shown to be associated with centrosomes and chromatin in the *Drosophila* syncytial embryo (64). Centrocortin (Cen) is also one of these RNAs. The Cen protein has been recently shown to be associated with Centrosomin and is important for cleavage furrow assembly in *Drosophila* embryos (56). There was a second RNA that showed a strikingly similar localization to *cen*, the IKB Kinase-Like 2 (Ik2) mRNA. Ik2 is an IKK-related kinase and has been shown to be required for proper mRNA localization of oskar and gurken, which are essential in establishing proper anteroposterior embryonic patterning (60). Cen and Ik2 are part of the same locus on chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. They are found in opposite DNA strands and are arranged in a tail-to-tail configuration with their 3'UTRs overlapping, the length of the overlapping sequences is of 60 nucleotides (Figure 13A). In this study, we show that gene positioning of Cen and Ik2 on chromosome 2L of *D. melanogaster* plays a major role in targeting *cen* and *ik2* transcripts to centrosomes.

## 4.2 RESULTS

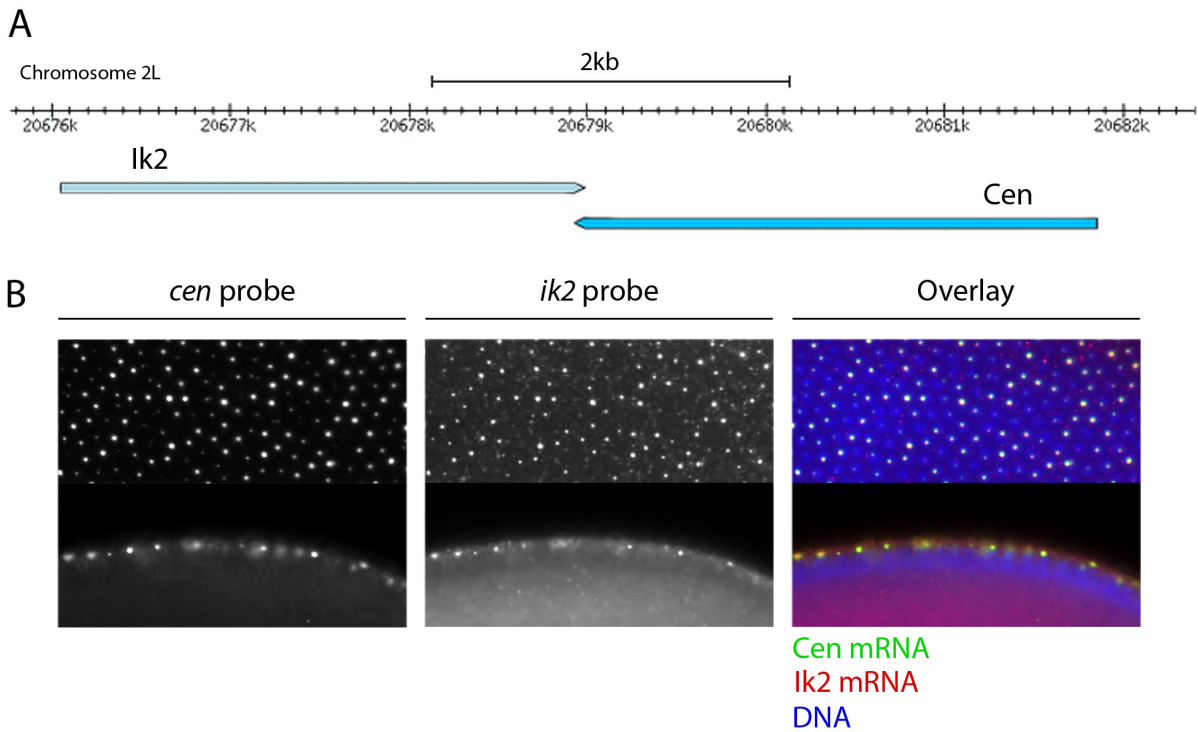
### ***Cen* and *ik2* co-localize to interphase centrosomes in *Drosophila* embryonic epithelial cells**

In a previous genome-wide screen for mRNA localization in *Drosophila* embryos, the *cen* mRNA was found to localize to centrosomes in *Drosophila* embryos (17). During interphase, the *cen* mRNA appears as foci in the apical cytoplasm of embryonic epithelial cells of *Drosophila* embryos (Figure 12A). The *cen* mRNA being maternally deposited, it is present in the developing embryo at early stages. This transcript is also localized to centrosomes and astral microtubules before cellularization occurs. Localization of *cen* is very dynamic and can be observed throughout mitosis using FISH (Figure 12). By performing a protein-mRNA co-staining, we have observed that the *cen* mRNA co-localizes with Centrosomin, which is found at centrosomes and is required for centrosome assembly and function (76). Interestingly, there was a second mRNA that was found to have a strikingly similar localization profile: the *Ik2* mRNA. The *Cen* and *Ik2* genes are part of the same locus on chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. The two genes are indeed organized in a head-to-head configuration in the genome with their 3'UTRs overlapping on both DNA strands (Fig 13A). In order to verify if these transcripts are co-localized, we conducted a dual-FISH experiment in which we labeled the *cen* mRNA and the *ik2* mRNA in the same embryos using specific anti-sense probes. We found that the *cen* and *ik2* mRNAs are perfectly co-localized to centrosomes in *Drosophila* embryonic epithelial cells (Figure 13B). Indeed, centrosomes are localized in the apical

cytoplasm of the epithelial cells. The fact that these mRNAs co-localize is intriguing, this suggests that there is a link between gene positioning and mRNA localization events.



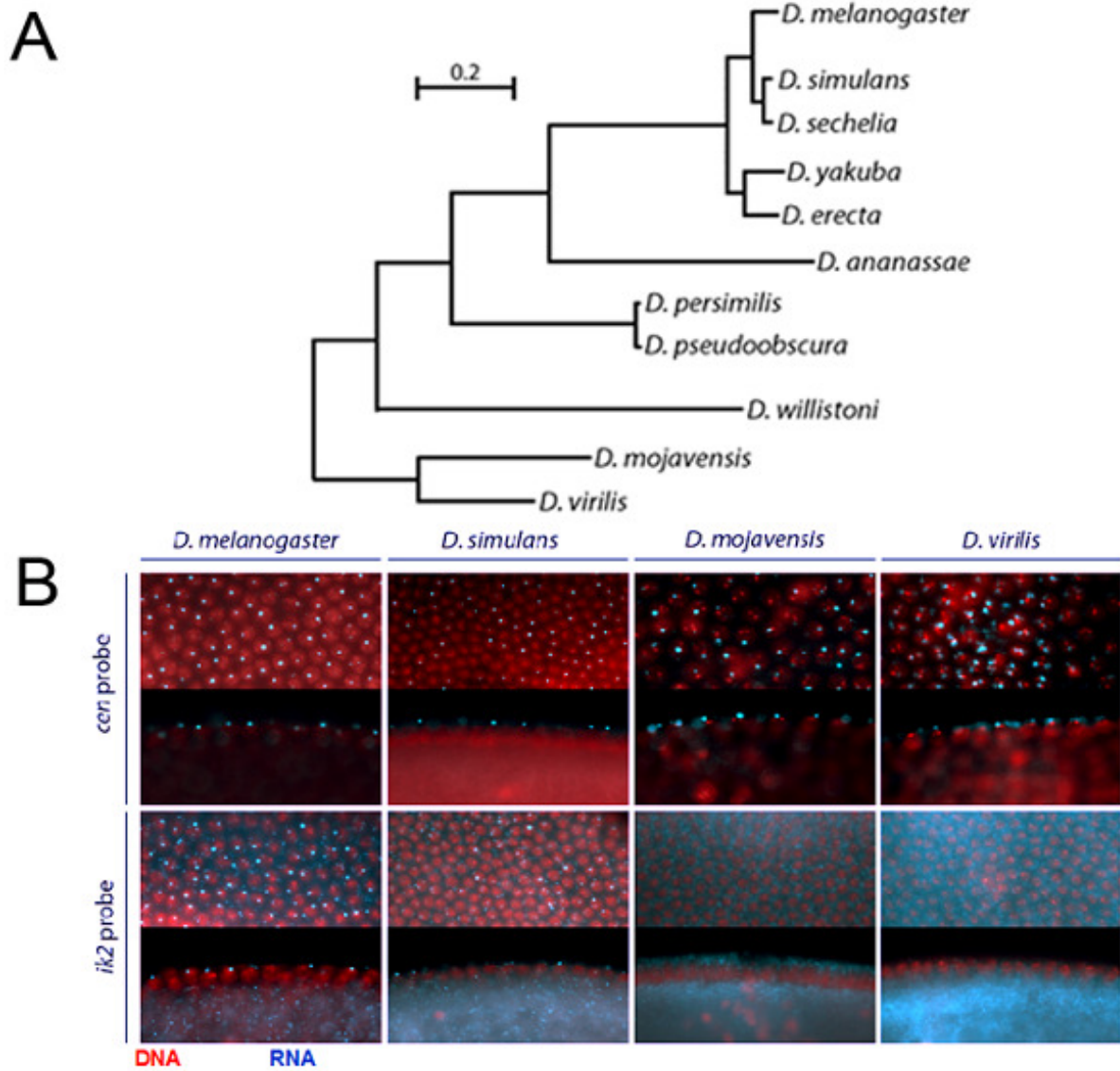
**Fig 12. The Centrocortin (Cen) mRNA localizes dynamically to centrosomes and astral microtubules in the developing *Drosophila* embryo.** A. FISH experiments using a *cen* probe on Oregon R (OreR) *Drosophila* embryos show that *cen* is dynamically localized to centrosomes and astral microtubules during the different steps of mitosis (Interphase, metaphase and anaphase). A single focus is present in interphase nuclei, whereas two foci are observed in metaphase and anaphase nuclei. These foci are located at the spindle poles, besides the metaphase plate and daughter chromosomes.



**Fig 13. Cen and ik2 mRNAs are co-localized to interphase centrosomes in *Drosophila* embryos.** A. The Cen and Ik2 genes are part of the same locus on chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. Both genes are arranged in a head-to-head configuration on opposite DNA strands, with 60 nucleotides of overlap. B. Dual-FISH was performed using a *cen* probe and an *ik2* probe on *Drosophila* embryos. The *cen* and *ik2* mRNAs are co-localized to centrosomes in *Drosophila* embryonic epithelial cells.

### **Evolutionary conservation of the *cen* and *ik2* localization**

In order to define the importance of genome structure on RNA localization, we did comparative studies using different *Drosophila* species. There are 12 *Drosophila* species that have been sequenced and annotated. As one might expect, these species are very different in terms of morphology, behavior as well as many other traits, but they share a lot of similarities as well. The *Drosophila* 12 Genomes Consortium identified some key differences between *Drosophila* species genomes. Some changes were found in protein-coding genes, non-coding RNAs as well as *cis*-regulatory elements (77). Gene positioning is also varying between species. As an example of that, sequencing data shows that there are species in which the *Cen* and *Ik2* genes are not located on the same locus. We looked at *Drosophila simulans*, *Drosophila mojavensis* and *Drosophila virilis*. *D. simulans* is phylogenically close to *D. melanogaster* and the locus around *Cen* and *Ik2* is the same. *D. mojavensis* and *D. virilis* are evolutionary distant from *D. melanogaster* and the *Cen* and *Ik2* orthologs are found on different chromosomes. In order to assess if gene proximity is important for *cen* and *ik2* localization, we did FISH experiments using probes specific to *Cen* and *Ik2* orthologs in different *Drosophila* species. We found that the centrosomal localization of *Cen* is conserved in all species. In contrast, *ik2* centrosomal foci are found in *D. melanogaster* and *D. simulans* where these genes are found in the same locus, but are inexistent in *D. virilis* and *D. pseudoobscura*, where these genes are dissociated (Figure 14). These results suggest that the proximity of *cen* and *ik2* is important for the co-localization of these transcripts to occur.

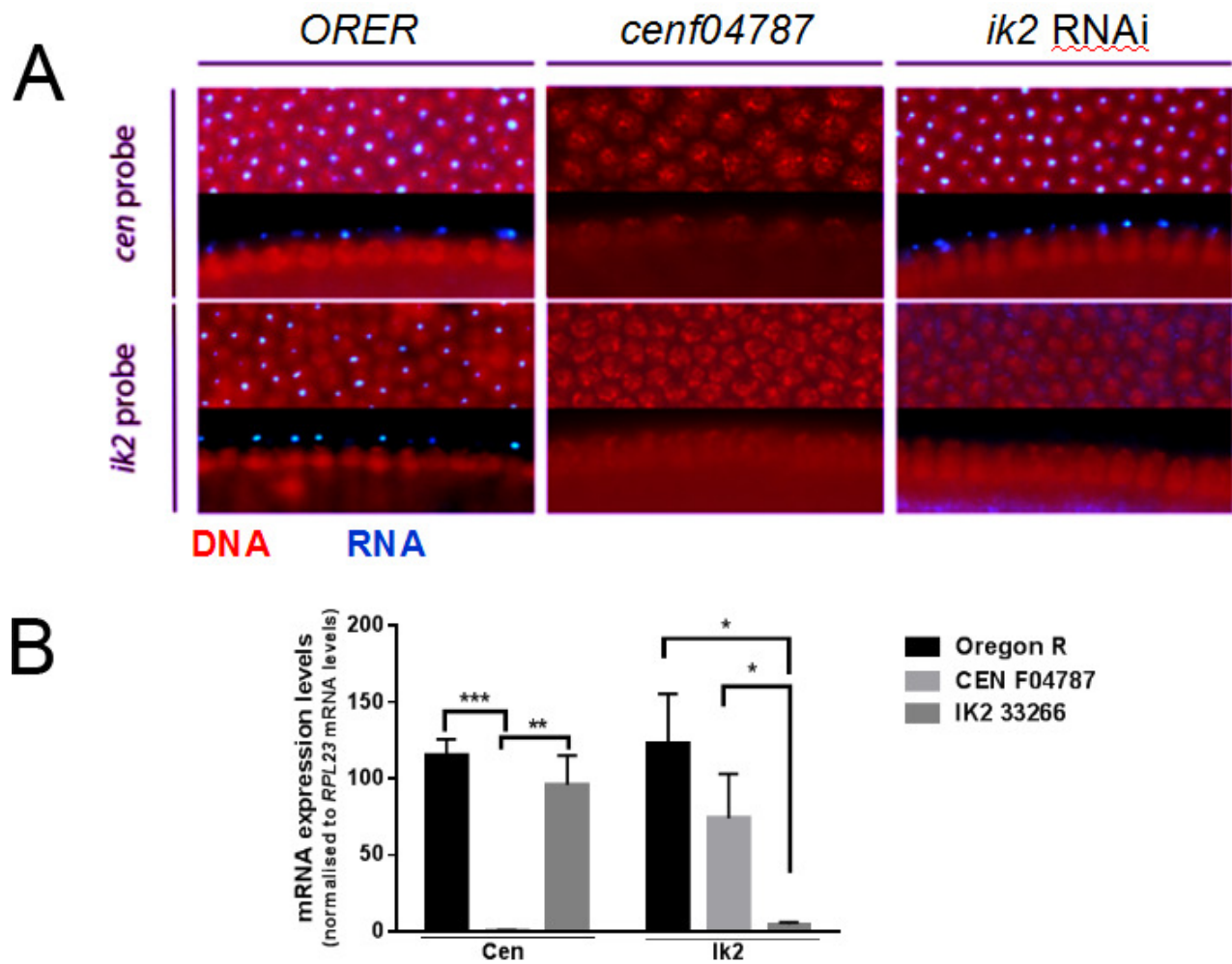


**Fig. 14. Evolutionary conservation of *cen* and *ik2* localization within different *Drosophila* species.** A. *Drosophila* phylogenetic tree. B. FISH experiments were performed on *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mojavensis* and *D. virilis* embryos.



### **Localization of the *ik2* transcript requires a functional *Cen* gene**

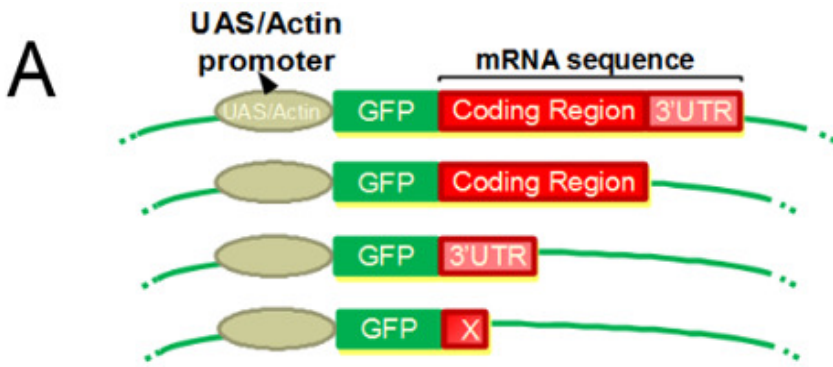
In order to define whether the localization of *cen* and *ik2* was dependent on the other gene's function, we conducted FISH experiments using DIG-labeled anti-sense probes against *cen* and *ik2* in *Cen* mutant and *Ik2* RNAi flies. The *Cen* mutant flies (*Cen*<sup>f04787</sup>) contain a P-element insertion in the coding DNA sequence of the gene. The mutant embryos are able to produce centrosomes, but exhibit mitotic defects (76). In order to generate flies with an *Ik2* loss of function, we crossed transgenic flies that encode RNAi against *Ik2*, under the control of the UAS promoter, with fly stocks with a Nanos Gal-4 driver line. We used the embryos of those flies for our analysis. We found that the loss of the *Cen* function leads to a complete loss of *ik2* localization to centrosomes (figure 15A). However, *Ik2* RNAi embryos did not show any defect in *Cen* targeting. To make sure the *Cen* mutation did not affect *ik2* expression levels, we did a gene expression profiling experiment by quantitative real-time PCR. We confirmed that the *Cen* mutants are RNA-null and that *Ik2* is still expressed in these embryos (figure 15B), suggesting that the phenotype we observed was not due to a loss of *Ik2* expression. Taken together, these results suggest that *Cen* is the main driver of the co-localization event, as it can localize properly in an *Ik2* RNAi background. The *Ik2* mRNA might be transported to centrosomes in a piggyback manner via a base-pairing mechanism involving *cen* and *ik2* mRNA molecules.



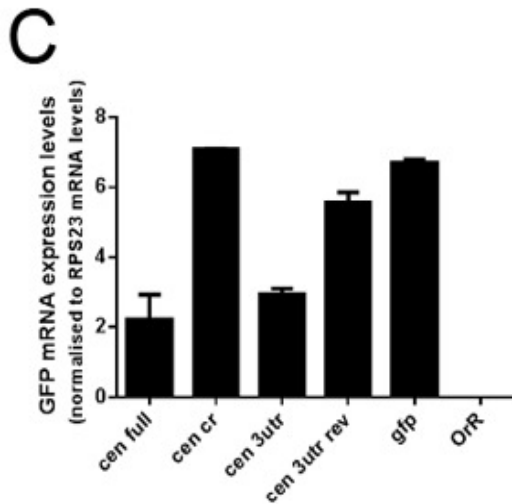
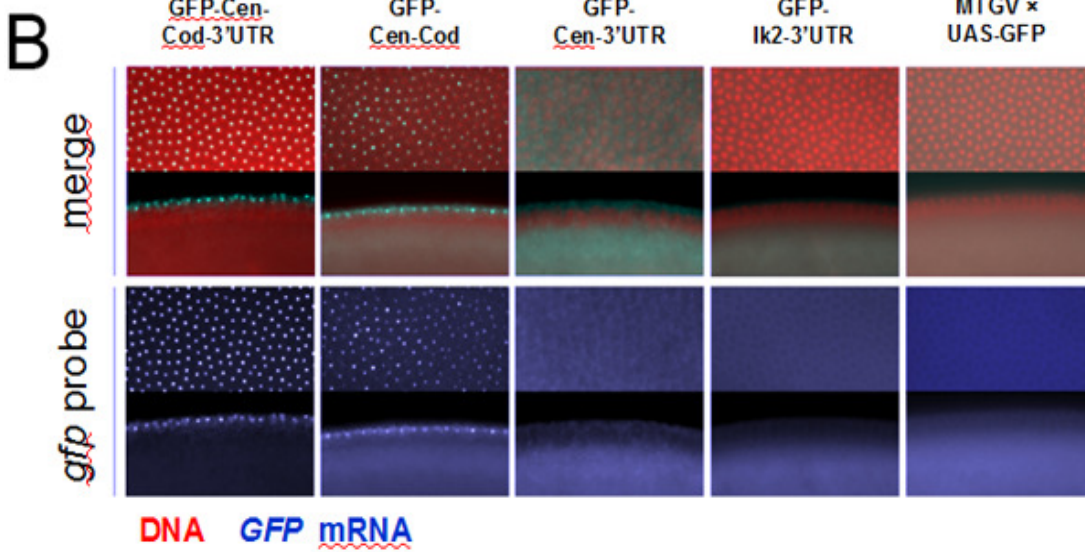
**Fig 15. Localization of *ik2* is dependent on a functional *Cen* gene.** A. FISH in Oregon R (OreR), *Cen* mutant (*cen*<sup>f04787</sup>) and *Ik2* RNAi (*Ik2* 33266) using an antisense DIG-labeled *cen* probe and *ik2* probe. Localization of *ik2* transcripts is lost in *cen* mutants whereas *cen* localization is maintained in *ik2* RNAi embryos. B. Real time PCR analysis showing expression level of *Cen* and *Ik2* in OreR, *Cen*<sup>f04787</sup> and *Ik2* 33266 embryos.

### **The coding region of *cen* is required for centrosomal targeting**

In order to identify the region that is necessary for *cen* targeting, we did a structure-function analysis using the UAS-Gal4 system, which allows us to express exogenous RNAs in fly embryos. We generated transgenic flies encoding chimeric RNAs in which the GFP sequence is fused in 5' to different segments of the *Cen* sequence (CDS + 3'UTR, CDS only, 3'UTR only and *Ik2* 3'UTR) (Fig 16A). We induced the expression of these transgenes in early developing embryos by crossing them with a maternal  $\alpha$ -tubulin Gal4-VP16 (MTGV) driver line. To visualize the transgenic transcripts, we did a FISH experiment using a *gfp* probe, which will allow us to discriminate between the endogenous *cen* and the *gfp-cen* chimeric RNA (Fig 16B). We found that the coding region of *cen* alone was sufficient for proper targeting to centrosomes. This result was surprising because untranslated regions contain a lot of regulatory motifs and some elements located in the 3'UTR were found to be important for the localization of other transcripts such as bicoid (31). In addition, the *gfp-cen* 3'UTR and *gfp-ik2* 3'UTR mRNAs were not able to localize to centrosomes, meaning that the 3'UTR doesn't contain an element that drives the targeting of *cen* to centrosomes in embryonic epithelial cells. We look at the *gfp-ik2* 3'UTR mRNA in order to find a potential palindromic *cis* regulatory motif in the 3'UTR. The presence of a palindromic element in the 3'UTR of the transcripts, which was what was first suspected, would have led to the localization of both *gfp-cen* 3'UTR and *gfp-ik2* 3'UTR mRNA. We therefore eliminated that possibility based on those results. Finally, we did qPCR analysis to quantify GFP mRNA expression level in transgenic embryos. The results confirm that our chimeric RNA is expressed in the transgenic embryo and is completely absent in the Oregon R flies.



*NGV* × *UAS-GFP*...



**Figure 16. The *cen* CDS is required for centrosomal targeting.** A. Schematic representation of structure-function analysis strategy. Constructs contains the GFP sequence fused in 5' to different segments of the *Cen* sequence (CDS + 3'UTR, CDS, 3'UTR and 3'UTR (reverse)). B. FISH experiments using an antisense DIG-labeled *gfp* probe were performed on transgenic fly embryos expressing *gfp-cen* CDS+3'UTR, *gfp-cen* CDS, *gfp-cen* 3'UTR, *gfp-cen* 3'UTR (reverse) and *gfp*. The *gfp-cen* CDS+3'UTR and *gfp-cen* CDS mRNAs are able to localize to centrosomes. However, the *gfp-cen* 3'UTR, *gfp-cen* 3'UTR (reverse) and *gfp* mRNAs remain unlocalized, suggesting that the CDS of *Cen* is necessary for centrosomal targeting. C. Real-time PCR analysis to probe expression level of GFP fusion transcripts in transgenic fly embryos.

#### 4.3 DISCUSSION

In this study, we showed that *cen* and *ik2* mRNAs are co-localized to centrosomes and we established the importance of gene positioning on chromosomes for controlling mRNA localization.

We found that the co-targeting of *cen* and *ik2* only occurs in species that have the head-to-head organization of *ik2* and that a functional gene is required to properly target *ik2* to centrosomes. Because some *Drosophila* species exhibit different localization patterns for *ik2*, it is possible that gene positioning is an evolutionary gain-of-function mechanism. These findings are consistent with a model in which the *cen* mRNA molecules interact in some way with *ik2*, probably via annealing of these mRNAs. In fact, because the gene sequences of *Cen*

and *Ik2* are overlapping on chromosome 2L, there is a perfect sequence complementarity at the 3' end of the genes, thus the mRNAs are complementary as well, making annealing possible. The fact that these mRNAs are so tightly co-localized suggests that they might be transported in the same mRNA granules. Such a mechanism would be a novelty, as co-transportation of mRNA molecules of different natures has not been characterized in the past. It was previously established that the *Cen* protein localizes to centrosomes and that it interacts with Centrosomin. Loss-of-function mutants of *Cen* exhibit mitotic defects and have cleavage furrow formation complications (76). Having the RNA localized to centrosomes may be a cellular mechanism to increase protein concentration at centrosomes where it is required for its function. It makes perfect sense that the *cen* mRNA is localized to centrosomes. However, future investigation will be required to determine if *Ik2* has a mitotic function. Identifying a centrosomal or mitotic function for *Ik2* would be an elegant way to show that movement of the genes in the genome during evolution would be a mechanism that would allow certain RNAs or proteins to gain a function. So far, *Ik2* has been shown to be implicated in various mechanisms such as reaper-mediated apoptosis (78), cell morphogenesis (79, 80) and regulation of cytoskeletal organisation (79). Consistent with this, the FISH signal for *cen* is more robust than the *ik2* signal, which is also a hint that *cen* is the main driver of the co-localization of these mRNAs.

We found that the CDS of *cen* is necessary to target a *gfp*-fusion transcript to centrosomes in fly embryos. Since there is a large collection of mRNAs targeted to the mitotic apparatus, it would be interesting to investigate if this is the case for all those mRNAs. One could expect that a conserved cis-regulatory motif would be found in these transcripts within the coding region.

#### 4.4 MATERIALS AN METHODS

##### **Fly stocks**

Fly stocks were maintained in incubators at 18°C and 70% relative humidity. Working stocks were maintained at 25°C. Cen<sup>f04787</sup> mutants flies were obtained from Harvard Medical School's Exelixis collection. Oregon R flies and Ik2 TRiP stocks (stock number 33266) were obtained from the Bloomington *Drosophila* stock center. *D. simulans*, *D. pseudoobscura*, *D. virilis* and *D. mojavensis* flies were obtained from the *Drosophila* Species Stock Center.

##### **Probe preparation**

RNA probes were obtained using the *Drosophila* Gene Collection (DGC) 1 and 2 CDNA libraries. The clones contain vectors in which the sequence of interest is flanked with promoter sequences for bacteriophage RNA polymerases (Sp6, T7 or T3). Bacterial glycerol stocks were kept at -80°C. Bacterial cultures were grown overnight and DNA Midi-Preps were performed on those cultures to generate templates for a PCR reaction. For the Midi-Preps, the Qiagen Midi-Prep kit was used. PCR amplicons were purified on agarose gel using the Qiagen Gel Purification Kit. These amplicons are used for an in vitro transcription reaction with a DIG-labeled or biotin-labeled rRTP mix to generate the RNA probes. To generate probes for *D. virilis* and *D. mojavensis* RNAs, a PCR reaction was performed using primers that are flanked with the T3 and T7 promoter sequences with genomic DNA of the corresponding species as a template. The whole gene sequence of the specific genes were amplified to generate the probe template.

### **Embryo processing and probe hybridation and probe detection steps**

The Fluorescent in situ hybridization procedure was performed as previously described (page 24-28 of this thesis and references 17 and 81). Embryos were collected on an egg laying plate for 4h to obtain the desired embryo stages. Probe detection was done using a Tyramide Signal Amplification kit and a Cy3 dye. Conditions used for dual-FISH experiments and immune-FISH experiments are supplied in reference 17).

### **Imaging procedure**

FISH samples were analyzed on a Leica DM5500B fluorescence microscope. For each sample, numerous images of stage 3 and 4 embryos at different magnifications (20X and 40X) were taken using the Volocity software in order to characterize mRNA localization properties. DAPI signal was false colored in red and Cy3 signal was false colored in green. The images were saved as a high resolution TIF file.

### **Gene expression profiling**

Total RNA was extracted for 0-4h embryos using the Trizol reagent from Life Technologies. Embryos were put in a Eppendorf microfuge tube. Embryos were manually grinded in 1 mL of Trizol using a nuclease-free pestle. 200  $\mu$ L of chloroform was added to each sample and each tube was briefly vortexed. The aqueous phase was the precipitated with isopropanol and resuspended in DEPC treated water.



Real-time PCR experiments were performed using the Viiia7™ Real-Time PCR System and a SYBR Green I dye from Roche. Relative abundance of specific mRNAs were calculated using the  $\Delta(\Delta C_t)$  method.

## 4. Discussion

Ce projet de recherche a permis de démontrer pour la première fois l'importance du positionnement des gènes dans le génome. Ce projet permet de caractériser la base d'un mécanisme moléculaire dans lequel deux molécules d'ARN messenger pourraient interagir ensemble afin de mener à une colocalisation serrée des deux ARNm en plus de déterminer la nécessité de la région codante de *cen* pour la localisation de celui-ci aux centrosomes, ce qui constitue une découverte intéressante considérant la tendance qu'ont plusieurs éléments régulateurs à se trouver dans les régions non codantes.

La colocalisation de *cen* et *ik2* est intéressante puisqu'ils sont arrangés en conformation tête-à-tête dans le génome. Une analyse informatique a permis de montrer que 761 paires de gènes présentaient une superposition de séquence au niveau du 3'UTR. Cependant, une observation de leur localisation à partir de la base de données publique Fly-FISH (<http://fly-fish.cabr.utoronto.ca/>) a montré que *cen* et *ik2* est la seule paire de gènes montrant une colocalisation aussi évidente de leur transcrite chez la *Drosophile*. Par contre, la localisation de plusieurs ARNm est encore inconnue puisque la base de données ne comprend pas 100% des gènes exprimés chez la *Drosophile*. Il serait intéressant d'observer la localisation de différentes paires de gènes superposés au niveau de leur 3'UTR et qui sont coexprimés durant

le développement embryonnaire par FISH afin de vérifier si ce phénomène de colocalisation est récurrent.

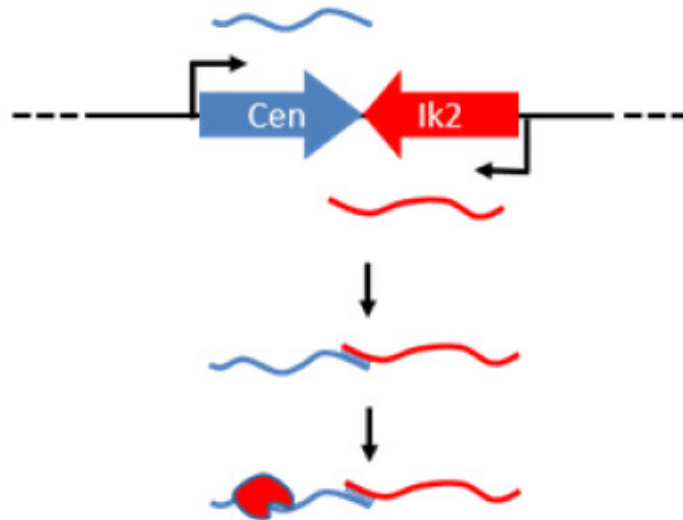
L'observation de la localisation de l'ARNm des orthologues de *cen* et *ik2* chez différentes espèces de *Drosophila* a permis de vérifier la conservation de la localisation des transcrits à travers l'évolution. La localisation de *cen* est conservée dans toutes les espèces. La localisation centrosomale observée au stade 4 embryonnaire est bien visible même chez les espèces plus éloignées évolutivement, *D. virilis* et *D. mojavensis*. La conservation robuste de ce phénotype suggère que la localisation du transcrit elle-même joue un rôle important lors du développement. Bien que la protéine Cen ait été définie comme importante pour la division cellulaire (76), un rôle potentiel de la molécule d'ARNm elle-même dans le contrôle de la mitose n'a pas encore été caractérisé. Contrairement à *cen*, la localisation de *ik2* n'est pas conservée dans *D. virilis* et *D. mojavensis*, ce qui suggère que Ik2 n'aurait pas de rôle dans le maintien ou la progression de la mitose comme Cen ou d'autres ARNm localisant au niveau de l'appareil mitotique. De ce fait, la localisation de Ik2 aux centrosomes dans *D. melanogaster* et *D. simulans* est donc probablement le produit d'une interaction physique avec *cen* suivant la transcription et ces deux ARNm seraient transportés jusqu'à leur destination dans les mêmes granules d'ARNm.

L'observation des mutants Cen et des mouches knockdown pour Ik2 a permis de démontrer l'importance de la fonction de Cen dans la localisation de Ik2. Le fait que la perte de fonction de Cen mène à une délocalisation de *ik2* suggère que *cen* est le régulateur principal de cette colocalisation qui est observée aux centrosomes. L'ARNm *ik2* serait transporté par défaut aux

centrosomes puisque la séquence complémentaire retrouvée dans son 3'UTR lui permettrait de s'apparier avec l'ARNm de *cen*. Un autre mécanisme possible serait qu'un élément de localisation palindromique serait localisé au niveau du 3'UTR de ces ARNm, ce qui mènerait à leur transport au même endroit par les mêmes régulateurs en *trans*. Un mécanisme de transport par interaction physique ARN-ARN serait une nouveauté très intéressante dans le domaine de la localisation des ARNm. D'ailleurs, il a déjà été démontré que certains ARNm dimérisent dans des granules de transport avant d'être localisés dans la cellule, dont *bicoid* (30) et *oskar* (82), deux des ARNm les plus étudiés à ce jour.

L'étude structure-fonction sur la localisation des transcrits *cen* à l'aide du système UAS-Gal4 montrant que la région codante est nécessaire au transport de *cen* aux centrosomes constitue un résultat surprenant mais très intéressant. Le fait que la plupart des éléments régulateurs étant retrouvés au niveau des régions codantes suggérait à prime-abord que la région 3'UTR de *cen* aurait été nécessaire à sa localisation mais ce ne fut pas le cas. En fait, l'ARN de fusion GFP-*cen*-3'UTR n'est pas du tout localisé dans les embryons de mouches transgéniques exprimant cette fusion maternellement. Ce résultat montre qu'un élément de localisation se trouve dans la région codante de *cen*. La séquence exacte de cet élément n'a pas été déterminée par cette expérience mais il est possible de le faire par injection d'ARNm fluorescent *in vivo* dans des embryons en développement. Les éléments régulateurs agissant sur cette séquence peuvent être définis *in vivo* avec un crible RNAi sur des gènes encodant pour des RBPs à l'aide de lignées de mouches transgéniques inductibles pouvant exprimer un RNAi maternellement.

Somme toute, les résultats de cette étude nous proposent un modèle dans lequel les molécules d'ARN de *cen* et *ik2* s'apparient entre elles suite à la transcription dû à la complémentarité des séquences 3'UTR de ces transcrits (Figure 17). La machinerie de transport serait recrutée à *cen* via un élément de localisation situé dans la région codante et le transcrit de *ik2* serait transporté également à travers ces même granules de transport aux centrosomes. La séquence exacte de l'élément ainsi que l'identité de l'élément régulateur doivent encore être déterminés.



**Fig 17. Modèle proposé du mécanisme de localisation de *cen* et *ik2* aux centrosomes.** Les molécules de *cen* (bleu) et *ik2* (rouge) sont produites simultanément dans l'embryon de *Drosophila*. Elles s'apparient physiquement entre elles par des interactions Watson-Crick. Finalement, un élément régulateur encore inconnu (illustré en rouge), vient lier un élément régulateur situé dans la région codante de *cen* pour initialiser le transport.

## 5. Conclusion

La compréhension de la division cellulaire est d'importance capitale dans le domaine de la recherche sur la santé. Puisque des défauts de division cellulaires peuvent mener à l'instabilité génomique et au cancer, chaque aspect de régulation de la division cellulaire qui peut être élucidé constitue un savoir très important. Ce projet promet de caractériser pour la première fois l'importance de la localisation des ARNm dans le contrôle de la mitose. De plus, un mécanisme de localisation impliquant une interaction directe entre des régions complémentaires à deux molécules d'ARNm serait une nouveauté très intéressante dans le milieu de recherche de la localisation des ARNm. Ceci constituerait une démonstration intéressante d'un nouveau rôle de la transcription bidirectionnelle chez les animaux. Ce type de mécanisme pourrait être très récurrent considérant le nombre d'unités de transcription qui se superposent dans les génomes de plusieurs espèces, y compris le génome humain. L'étude des mécanismes de localisation des ARNm étant un domaine de recherche relativement jeune, les découvertes fondamentales pourront servir de base pour des projets cliniques dans le futur.

## 6. Bibliographie

1. Crick, F. H. C. On Protein Synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 139,163 (1958).
2. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563 (1970).
3. Jenny, A et al. A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development* 133, 2827-2833 (2006).
4. Blobel G & Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 67, 852-862 (1975).
5. Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38 (1984).
6. Pelham H. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends. Biochem. Sci.* 15, 483-486 (1990).
7. Jeffery W. R. & Wilson L. J. Localization of messenger RNA in the cortex of *Chaetopterus* eggs and early embryos. *J Embryol Exp Morphol* 75, 225-239 (1983).
8. St Johnston, D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363-375 (2005).
9. Paquin, N. & Chartrand, P. Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol* 18, 105-111 (2008).

10. Yao, J., Sasaki, Y., Wen, Z., Bassell, G. J. & Zheng, J. Q. An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* 9, 1265-1273 (2006).
11. Zhang, H. L. et al. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31, 261-275 (2001).
12. Richter, J. D. & Klann, E. Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev* 23, 1-11 (2009).
13. Rebagliati, M. R. et al. Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* 42, 769-777 (1985).
14. Gavis, E. R., Lehmann, R. Localization of Nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71, 301-313 (1992).
15. Berleth, T. et al. The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 7, 1749-1756 (1988).
16. Martin, K. C. & Ephrussi A. mRNA localization : gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136, 719-730. (2009).
17. Lecuyer, E. et al. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* 131, 174-187 (2007).
18. Kloc, M., Wilk, K., Vargas, D., Shirato, Y., Bilinski, S. & Etkin, L. D. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 132, 3445-3457 (2005).

19. Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q., & Spector, D. L. Regulating gene expression through mRNA nuclear retention. *Cell* 123, 249-263 (2007).
20. Tekotte, H. & Davis, I. Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* 18, 636-642 (2002).
21. Forrest, K. M. & Gavis, E. R. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* 13, 1159-1168 (2003).
22. Bashirullah, A. et al. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 18, 2610-2620 (1999).
23. Bullock, S. L. & Ish-Horowicz, D. Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* 414, 611-616 (2001).
24. dos Santos, G., Simmonds, A. J. & Krause, H. M. A stem-loop structure in the wingless transcript defines a consensus motif for apical RNA transport. *Development* 135, 133-143 (2008).
25. Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. & Bullock, S. L. Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev* 23, 1546-1558 (2009).
26. Muller M. et al. A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS Biol* 9. (2011).



27. Müller, M., Heuck, A., & Niessing, D. Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* 64, 171-180 (2007).
28. Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. & Bullock, S. L. Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev* 23, 1546-1558 (2009).
29. Bianco, A. et al. Bicaudal-D regulates fragile X mental retardation protein levels, motility, and function during neuronal morphogenesis. *Curr Biol* 20, 1487-1492 (2010).
30. MacDonald, P. M., Kerr, K., Smith, J. L. & Leask, A. RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* 118, 1233-1243 (1993).
31. Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. & Nüsslein-Volhard, C. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO J* 16, 1751-1758 (1997).
32. Kislauskis, E. H., Zhu, X. & Singer, R. H. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127, 441-451 (1994).
33. Patel, V. L. et al. Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes Dev* 26, 43-53 (2012).
34. Ross A. F. et al. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 2158-2165 (1997).

35. Ray, D. et al. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499, 172-177 (2013).
36. Holt, C.E. & Bullock S.L. Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326, 1212-1216 (2009).
37. Jansen, R.P. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cel Biol* 4, 247-256 (2001).
38. Tomancak, P. et al. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol* 3 (2002).
39. Dubowy, J. & MacDonald, P. M. Localization of mRNAs to the oocyte is common in *Drosophila* ovaries. *Mech Dev* 70, 193-195 (1998).
40. Mili, S., Moissoglu, K. & Macara, I. G. Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature* 453, 115-119 (2008).
41. Deber, C. M. & Reynolds, S. J. Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem* 24, 113-134 (1991).
42. Inouye, H. & Kirschner, D. A. Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data. *J Neurosci Res* 28, 1-17 (1991).
43. Colman, D. R., Kreibich, G., Frey, A.B. & Sabatini, D. D. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95, 598-608 (1982).

44. Verity, A. N. & Campagnoni, A. T. Regional expression of myelin protein genes in the developing mouse brain: in situ hybridization studies. *J Neurosci Res* 21, 238-248 (1988).
45. Mazia, D. & Dan, K. The isolation and biochemical characterization of the mitotic apparatus of dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38, 826-838 (1952).
46. Salmon, E. D., & Segall, R. R. Calcium-labile mitotic spindles isolated from sea urchin eggs (*Lytechinus variegatus*). *J. Cell Biol.* 86, 355-365 (1980).
47. Ris, H. The cytoplasmic filament system in critical point-dried whole mounts and plastic-embedded sections. *J. Cell Biol* 100, 1474-1487 (1985).
48. Blower, M. D., Feric, E., Weis, K. & Heald, R. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol* 179, 1365-1373 (2007).
49. Lambert, J. D. & Nagy, L. M. Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages, *Nature* 420, 682-686 (2002).
50. Spana, E. P., Kopczynski, C., Goodman, C. S., Doe, C. Q. Asymmetric localization of *numb* autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* 121, 3489—3494 (1995).
51. Groisman, I. & al. CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103, 435-447 (2000).

52. Elicovich, C., Peset, I., Vernos, I., & Méndez, R. Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 10, 858-865 (2008).
53. Heidemann, S. R., Sander, G. & Kirschner M. W. Evidence for a functional role of RNA in centrioles. *Cell* 10, 337-50 (1977).
54. Peterson, S. P. & Berns M. W. Evidence for centriolar region RNA functioning in spindle formation in dividing PTK2 cells. *J Cell Science* 34, 289-301 (1978).
55. Sharp J. A. et al. Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Mol Biol Cell* 22, 4312-4323 (2011).
56. Kao, L. R. & Megraw, T. L. Centrocortin cooperates with centrosomin to organize *Drosophila* embryonic cleavage furrows. *Curr Biol* 19, 937-942 (2009).
57. de Saint Phalle, B. & Sullivan W. Spindle assembly and mitosis without centrosomes in parthenogenetic *Sciara* embryos. *J Cell Biol* 141, 1383–1391 (1998).
58. Raff, J. W. & Glover, D. M. Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 57, 611–619 (1989).
59. Yasuda, G. K., Baker, J., & Schubiger, G. Independent roles of centrosomes and DNA in organizing the *Drosophila* cytoskeleton. *Development* 111, 379–391 (1991).
60. Shapiro, R. S. & Anderson, K. V. *Drosophila* Ik2, a member of the I kappa B kinase family, is required for mRNA localization during oogenesis. *Development* 133, 1467-1475 (2006)

61. Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. & Zhu, J.K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123, 1279–1291 (2005).
62. Jin, H., Vacic, V., Girke, T., Lonardi, S. & Zhu, J.K. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Mol. Biol.* 9, 6 (2008).
63. Okamura, K. & al. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol.* 15, 581-590 (2008).
64. Phelps, C. B. & Brand, A. H. Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System. *A Companion to Methods in Enzymology* 14, 367–379 (1998).
65. Zhang Y., Liu X. S. , Liu Q. R., Wei L. Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. *Nucleic Acids Res* 34. 3465-3475 (2006).
66. Katayama S. et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566 (2005).
67. Yelin R. et al. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat. Biotechnol* 21, 379-356 (2003).
68. Lipman D. J. Making (anti)sense of non-coding sequence conservation. *Nucleic Acids Res* 25, 3580-3583 (1997).
69. Gu, R., Zhang, Z., Decerbo, J. N. & Carmichael G. G. Gene regulation by sense-antisense overlap of polyadenylation signals. *RNA* 15, 1156-1163 (2009).

70. Djebali, S. et al. Evidence for transcript networks composed of chimeric RNAs in human cells. *PLoS One* 7 (2012).
71. Ponthier D. B. & Gribnau J. Xist regulation and function explored. *Hum Genet* 2, 223-236 (2011).
72. Faghihi M. A. & Wahlestedt C. RNA interference is not involved in natural antisense mediated regulation of gene expression in mammals. *Genome Biol* 7 (2006).
73. Lasa I et al. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 20172-20177 (2011).
74. Kawagushi, S. & Zheng, Y. Characterization of a *Drosophila* centrosome protein CP309 that shares homology with Kendrin and CG-NAP. *Mol Biol Cell* 15 (2004).
75. Maldonado-Codina, G. & Glover, D. M. Cyclins A and B associate with chromatin and the polar regions of spindles, respectively, and do not undergo complete degradation at anaphase in syncytial *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 4, 967-976 (2004).
76. Megraw, T. L. & al. The centrosomin protein is required for centrosome assembly and function during cleavage in *Drosophila*. *Development* 126, 2829-2839 (1999).
77. *Drosophila* 12 Genomes Consortium. Evolution of Genes and Genomes on the *Drosophila* Phylogeny. *Nature* 450, 203-218 (2007).
78. Kuranaga, E. & al. *Drosophila* IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* 126, 583-596 (2006).

79. Dubin-Bar, D. & al. The Drosophila IKK-related kinase (Ik2) and Spindle-F proteins are part of a complex that regulates cytoskeleton organization during oogenesis. *BMC Cell Biol* 9 (2008).
80. Oshima, K. & al. IKK epsilon regulates F actin assembly and interacts with Drosophila IAP1 in cellular morphogenesis. *Curr Biol* 16, 1531-1537 (2006).
81. Legendre, F. & al. Whole mount RNA fluorescent in situ hybridization of Drosophila embryos. *J Vis Exp* 71 (2013).
82. Jambor, H., Brunel, C. & Ephrussi, A. Dimerization of oskar 3' UTRs promotes hitchhiking for RNA localization in the Drosophila oocyte. *RNA* 17, 2049-2057 (2011).

## 7. Remerciements

D'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Éric Lécuyer, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe alors que j'étais un jeune étudiant sans expérience de recherche. Son encadrement au cours de mes études dans son laboratoire m'a permis de développer un esprit critique vis-à-vis la recherche scientifique et d'améliorer mes habitudes de travail.

Ensuite, je tiens à remercier mes collègues de travail. Durant mon séjour dans le laboratoire et à l'Université, j'ai développé des liens d'amitié avec plusieurs personnes, notamment avec les plus jeunes étudiants qui ont rejoint le laboratoire après moi et certains collègues de classe. Un grand merci à eux pour leur support.

Enfin, je tiens à remercier ma famille. Mon frère Vincent m'a été d'un soutien exceptionnel. J'aimerais remercier mes parents pour m'avoir permis de faire ces études et qui m'ont appuyé tout au long de ma maîtrise.