

Université de Montréal

Étude de l'expression et des partenaires protéiques de l'ARN TERRA (Telomeric Repeat-containing RNA) dans les cellules de cancer humaines

Par

DALACHI MYRIAM

Département de Biochimie et médecine moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise

En Biochimie

Option Générale

Août 2020

© DALACHI MYRIAM, 2020

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorale

Ce mémoire intitulé

Étude de l'expression et des partenaires protéiques de l'ARN TERRA (TElomic Repeat-containing RNA) dans les cellules de cancer humaines

Présenté par

DALACHI Myriam

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Martin Sauvageau
Président-rapporteur

Pascal Chartrand
Directeur de recherche

François Major
Membre du jury

Résumé

Les télomères forment les extrémités des chromosomes chez les eucaryotes. Ces séquences répétées en tandem 5'-TTAGGG-3' font partie d'un complexe nucléoprotéique appelé shelterin. En effet, cet assemblage de protéines télomériques permet la protection des extrémités des chromosomes, permettant à celles-ci de ne pas être reconnues comme des cassures dans l'ADN et d'activer les voies de réparation de l'ADN. Les télomères ont longtemps été reconnus comme étant des zones de transcription inactives, ce jusqu'en 2007 lorsqu'une équipe de recherche découvrit un ARN non codant appelé TERRA (Telomeric Repeat containing RNA). Ce dernier a suscité de nombreuses questions : quel est le rôle de cet ARN? Comment est-il exprimé et régulé? Interagit-il avec d'autres facteurs cellulaires? Les différentes recherches menées sur cet ARN ont permis de conclure que celui-ci était fréquemment induit dans les cellules de cancer, que ses partenaires d'interactions sont nombreux, mais que ses fonctions restent encore mal définies. Par ailleurs, ces différentes études ont toujours été ou presque réalisées sur des cellules fixées, sur une population totale d'ARN télomérique TERRA.

Afin d'apporter de nouvelles réponses et de mieux caractériser cet ARN, nous avons étudié ce transcrit dans des cellules de cancer humain en utilisant la technique de microscopie en temps réel, qui permet de récolter des données sur la dynamique, la localisation de cet ARN et ses éventuels partenaires. De plus, nous nous sommes intéressés à des molécules uniques de TERRA issues du télomère 15q en exploitant la technique de marquage avec des tiges-boucles MS2 (MS2-GFP).

Cette étude de microscopie a permis de découvrir deux types de population de l'ARN TERRA 15q : une population caractérisée par des assemblages d'ARN dit clusters (agrégats d'ARN) et une population plus singulière qui semble avoir une diffusion plus importante dans le noyau de la cellule. Par ailleurs, l'expression de l'ARN TERRA semble être différente d'un type cellulaire à un autre et nous avons donc cherché à connaître le niveau d'expression de cet ARN au sein de la lignée étudiée au cours de ce projet de recherche.

Enfin, afin de découvrir de nouveaux rôles pour cet ARN, nous avons développé une approche de co-immunoprécipitation de l'ARN TERRA pour identifier des interactions avec des

protéines du complexe shelterin comme TRF2, ou des protéines liant l'ARN comme hnRNP-A1 ou encore FUS.

Mots-clés : TERRA, télomères, Microscopie en temps réel, cancer, ARN non codant, MS2-GFP, cellule humaine, molécule unique, cellule vivante

Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures that cap the physical ends of eukaryotic chromosomes. They consist of repetitive DNA sequences 5'-TTAGGG-3' assembled with proteins which form the shelterin complex. This complex protects the ends of chromosomes by inhibiting DNA repair pathways at telomeres and avoid their recognition as double-strand breaks. Telomeres have been identified as a transcriptionally silent zone until 2007 when a noncoding RNA called TERRA (TElomeric Repeat containing RNA) transcribed from telomeres was discovered. This RNA gave rise to many questions: How is TERRA regulated? How is TERRA expressed? Does TERRA interact with proteins, DNA or RNA? After several studies, we know that TERRA is frequently expressed in cancer cells and it interacts with a large proteome. Nevertheless, its specific function remains unknown.

In this thesis, we studied this RNA in human cancer cells using live-cell microscopy which allowed us to get information on TERRA's dynamics, localization and its interactome. Moreover, we used single-molecule imaging on TERRA 15q labeled by the MS2-GFP system, which allowed the visualization of TERRA transcripts. This study resulted in the discovery of two types of TERRA population from telomere 15q: one of the population is characterized by the formation of clusters and a second population is constituted of unique molecules more dynamic in the nucleus.

Finally, in order to better understand TERRA's functions, we developed a new approach which consists on immunoprecipitating TERRA using the MS2 stem-loops as a tag to identify TERRA-interacting proteins such as the telomeric factor TRF2 or RNA-binding proteins like hnRNP -A1 or FUS.

Keywords: TERRA, telomeres, microscopy, live cell imaging, cancer, Non-Coding RNA, MS2-GFP, human cells, single molecule, live cell

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des sigles et abréviations	16
Remerciements	21
Chapitre 1 – INTRODUCTION.....	23
1.1 Fonctions des télomères.....	24
1.1.1 Le support de l’information génétique.....	24
1.1.2 Les télomères humains et l’ADN télomérique.....	24
1.1.3 Structures formées par les télomères : la boucle T et les G-quadruplexes.....	25
1.1.4 Les protéines télomériques forment le complexe <i>shelterin</i>	29
1.2 La télomérase : structure et fonction.....	30
1.3 Biogenèse de TERRA.....	34
1.3.1 Définition.....	34
1.3.2 Expression de TERRA.....	37
1.4. Régulation de TERRA.....	39
1.4.1 Régulation de TERRA au cours du développement	39
1.4.2 Régulation de TERRA par les facteurs épigénétiques	40
1.5 Régulateurs protéiques de TERRA.....	42
1.6 Régulation de TERRA par la longueur des télomères	43
1.7 Le protéome associé à TERRA et ses fonctions	44
1.7.1 Le protéome associé à TERRA.....	44

1.7.2 TERRA et l'intégrité du génome	46
1.7.3 TERRA et la régulation de la chromatine.....	48
1.7.4 TERRA et son rôle dans le cancer	51
1.8 Les différentes techniques d'imagerie de l'ARN en temps réel.....	53
1.9 Objectifs et approches expérimentales proposés	56
CHAPITRE 2 - MATERIEL ET METHODES	59
2.1 Culture cellulaire des cellules AGS	60
2.2 Développement de cellules AGS exprimant l'ARN TERRA 15q endogène avec des tiges-boucles MS2.....	60
2.3 Microscopie en temps réel.....	63
2.4 Extraction d'ARN et RT-PCR.....	63
2.4.1 Extraction d'ARN total.....	63
2.4.2 Traitement DNase.....	64
2.4.3 Réaction de réverse transcription - PCR.....	64
2.4.4 PCR quantitatif.....	64
2.5 Immunoprécipitation de l'ARN.....	65
2.6 Immunobuvardage de type Western	65
2.7 Analyse statistique.....	66
CHAPITRE 3 - RÉSULTATS.....	67
Objectif 1 : Analyse de la dynamique de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS en microscopie en temps réel.	69
3.1 Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR quantitatif et RT-PCR	69
3.2 Imagerie de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS	71
3.3 L'ARN TERRA 15q MS2 est présent sous deux formes dans la cellule.....	72

3.4 L'ARN TERRA 15q MS2 est fréquemment exprimé dans nos clones cellulaires.....	75
3.5 Les clusters TERRA 15q MS2 colocalisent avec les télomères	77
Objectif 2. Identification des partenaires protéiques de l'ARN TERRA 15q	79
3.6 Immunoprécipitation de l'ARN TERRA 15q MS2	79
3.7 Identification de partenaires protéiques de l'ARN TERRA 15q MS2.....	82
CHAPITRE 4 – DISCUSSION	91
4.1 La microscopie en temps réel et l'utilisation du système MCP-GFP permettent d'identifier deux types de population d'ARN TERRA 15q en cellule vivante à l'échelle de la molécule unique	93
4.2 Développement d'un nouveau protocole d'immunoprécipitation de l'ARN TERRA 15qMS2 pour la détection de ses partenaires protéiques.....	96
CONCLUSION	100
Références bibliographiques	101
Annexes	107

Figure 1 - L'ADN télomérique (modifié de Palm, de Lange T. 2008).....	24
Figure 2 - L'ADN télomérique et la structure de la boucle T (modifié de Palm, de Lange T. 2008).	26
Figure 3 - Tétrade de guanines (modifié de (Hansel-Hertsch, Di Antonio et al. 2017).....	27
Figure 4 - Schéma des différentes structures G-quadruplexes au niveau de l'ADN, l'ARN ou l'ADN : ARN.....	28
Figure 5 - Topologie unimoléculaire des structures G-quadruplexe humaines (Dai, 2007).....	28
Figure 6 - Représentation schématique du complexe shelterin (modifié de Giraud-Panis, Pisano et al. 2013).	30
Figure 7 - Schéma de la protéine TERT (modifié de (Wu, Upton et al. 2017).....	31
Figure 8 - Structure secondaire de hTR (Legassie and Jarstfer 2006).....	32
Figure 9 - Structure de la télomérase humaine (Nguyen, Collins et al. 2019).....	33
Figure 10 - Biogénèse de TERRA (modifié de Feuerhahn et al, 2010).....	36
Figure 11 - TERRA est régulé au cours du cycle cellulaire (modifié de Feuerhahn, 2010).	40
Figure 12 - Schéma des boucles R formées par TERRA au niveau des télomères (modifié de Rippe et Luke, 2015).	46
Figure 13 - Représentation de la chromatine au niveau sub-télomérique et télomérique et des interactions TERRA-protéines (Olivia-Rico et Herrera, 2017).	50
Figure 14 - Le système MS2-GFP (modifié de Rodriguez, Condeelis et al. 2007).....	53
Figure 15 - Schéma représentant les systèmes MS2-PP7-protéine fluorescente (modifié de Lenstra and Larson 2016).	54
Figure 16 - Représentation du principe des balises moléculaires (modifié de Tyagi and Kramer 1996).	55
Figure 17 - Séquences MS2 au sein du télomère 15.....	61
Figure 18 - Description du modèle de marquage de l'ARN TERRA par les tiges boucles MS2 au niveau du chromosome 15 et southern blot des clones AGS #22 et AGS#56 (Avogaro, Querido et al. 2018)	62
Figure 19 - Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q dans les cellules AGS WT, AGS#22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par RT-PCR quantitatif (N=3).....	69

Figure 20 - Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS WT, AGS#22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par RT-PCR quantitatif.	70
Figure 21 - Analyse de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR dans les cellules AGS WT, clones AGS #22 et AGS#56.	70
Figure 22 - Imagerie de l'ARN TERRA MS2 15q et des télomères au sein des clones AGS WT, AGS #22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par microscopie en temps réel en cellule vivante.....	72
Figure 23 - Distribution Gaussienne des deux populations d'ARN TERRA MS2 15q distinctes.	73
Figure 24 -Représentation gaussienne de la dynamique des particules et des foci (clusters) d'ARN TERRA 15q MS2.....	74
Figure 25 - Coefficients de diffusion (Log D) des particules et clusters d'ARN TERRA 15q MS2 dans les clones 1 et 2 (AGS #22 et AGS #56 respectivement). **** p<0.001.....	75
Figure 26 - Expression des ARN TERRA MS2 issu du chromosome 15q foci (clusters)	76
Figure 27 - Distribution des coefficients de diffusion (Log D) des télomères et des clusters d'ARN TERRA 15q MS2.....	77
Figure 28 - Imagerie des évènements de colocalisation entre les clusters d'ARN TERRA 15q MS2 (flèche bleu) et les télomères marqués par la protéine TRF1-mCherry (N=55; échelle : 5 µm)..	78
Figure 29 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 sans étape de sonication.	80
Figure 30 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 avec étape de sonication.....	81
Figure 31 - Détection de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 au sein des lysats cellulaires (input) et des fractions immunoprécipitées (IP).....	82
Figure 32 - Co-immunoprécipitation de la protéine hnRNP A1 avec la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 33 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP, AGS#22 avec étape de sonication et blocage des billes à la BSA 2% à 4 °C (2h).....	84
Figure 34 - La protéine hnRNP-A1 interagit avec l'ARN TERRA 15q MS2.	85

Figure 35 - Interaction de la protéine TRF2 avec l'ARN TERRA 15q MS2.	86
Figure 36 - Interaction de la protéine FUS avec l'ARN TERRA 15q MS2.	87
Figure 37 - L'actine n'interagit pas avec l'ARN TERRA 15q MS2.	88
Figure 38 - Détection de l'ARNm RPLP0 par RT-PCR.....	89

Liste des sigles et abréviations

ADN :	Acide Desoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
TERRA :	TElomeric Repeat containing RNA
MCP-GFP :	MS2 Coat Protein -Green Fluorescent Protein
hnRNP :	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
TRF2/TRF1 :	Telomeric repeat binding factor 2
ATM :	Ataxia-telangiectasia-mutated
ATR :	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
RNP :	Ribonucleoprotein particle
TERT :	Telomerase reverse transcriptase
hTR :	Human telomerase
POT 1 :	Protection of telomeres 1
NHEJ :	Non -homologous end joining
RH :	Homologue recombination
RMN :	Resonance magnétique nucléaire
TPE :	Telomeric position effect
RT-qPCR :	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
ALT :	Alternative lengthening of telomeres
WT :	Wild type cells
HP1 :	Heterochromatin protein 1
ICF :	Immunodeficiency, Centromeric Region Instability, Facial anomalies

ATRX : Alpha-thalassemia

T-Recs : Telomerase REcruitment Clusters

ORC : Origin recognition complex

RBP : RNA-binding protein

SILAC : Stable isotope labelling by amino acids in cell culture

DRIP : DNA : RNA immuniprecipitation

DDR : DNa damage response

LSD1 : Lysine specific histone demethylase 1

PML : Peomyelocytic leukemia

ASO : Antisense oligonucleotide

IPSCs : Induced Pluripotent Stem Cell

*Je dédicace ce mémoire à mes parents qui n'ont pas eu la
chance de réaliser de grandes études.*

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche Pascal Chartrand qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. Je souhaite le remercier de m'avoir donné l'opportunité d'accéder au monde de la recherche. En tant que Française, un de mes rêves était de poursuivre mes études à l'étranger et c'est grâce à lui que j'ai pu le réaliser. Je le remercie pour l'analyse critique qu'il a apportée au sein de mon travail scientifique. Il m'a toujours donné sa confiance et m'a permis de travailler en autonomie. J'ai eu l'occasion d'apprendre de nombreuses techniques et de travailler en collaboration avec le Dr. Cusanelli sur un article pour lequel je suis co-auteur. Je remercie Pascal d'avoir supporté mon comportement qui n'a pas toujours été très facile. Cette période à l'étranger a été très difficile pour moi, mais j'ai relevé ce défi et Pascal m'a beaucoup aidé à suivre ce projet malgré la difficulté de mes dernières expériences. Enfin, je le remercie pour ses commentaires et la correction de ce mémoire de fin d'études.

Je tiens à remercier Emilie Pourret qui m'a accompagné, au début de ma maîtrise, en culture cellulaire et au microscope. Je remercie également Emmanuelle Querido avec qui j'ai travaillé longtemps pour mon projet, elle a pu me guider pour la quantification, l'analyse ainsi que l'interprétation de mes résultats. Emmanuelle Querido a toujours apporté un regard critique sur mes recherches et m'a enseigné une rigueur scientifique. Aussi, elle m'a appris à manipuler les techniques très importantes pour ce projet comme la qPCR et l'exploitation du microscope spinning disc à fluorescence.

Je tiens à remercier Maxime Lalonde pour toutes ses remarques, hypothèses et discussion sur mon projet de recherche. Il m'a toujours conseillé et guidé pour obtenir des réponses lors de mes expériences. Il m'a beaucoup soutenu, moralement, lorsque j'obtenais des résultats inattendus. Je tiens à remercier Yani Bouaziz qui est devenu mon ami au sein du laboratoire et qui m'a apporté de la joie pendant ces longues journées de recherche. Je remercie Lionel Condé qui m'a soutenu lors de ce projet en me faisant part de sa critique scientifique.

Chapitre 1 – INTRODUCTION

1.1 Fonctions des télomères

1.1.1 Le support de l'information génétique

Les organismes vivants utilisent l'ADN comme support de l'information génétique. Les caractéristiques de complémentarité des bases nucléiques permettent la réplication et la transmission de l'information génétique de manière héréditaire. Chez les eucaryotes, le génome nucléaire est composé exclusivement de chromosomes linéaires, ceci implique l'existence d'extrémités appelées télomères que nous allons définir dans cette première partie de l'introduction.

1.1.2 Les télomères humains et l'ADN télomérique

L'origine du terme télomère provient de la langue grecque, télos ou Τέλος qui signifie « fin » et méros ou μέρος qui signifie « partie ». On comprend alors que les télomères sont situés aux extrémités des chromosomes linéaires eucaryotes et constituent l'ADN télomérique. Ce dernier est formé de séquences nucléotidiques répétées en tandem (5'-TTAGGG-3') sur 2 000 à 20 000 paires de bases avec une extrémité simple brin 3' sortante de quelques dizaines à quelques centaines de bases riches en guanines (Palm & de Lange, 2008) (Figure 1).

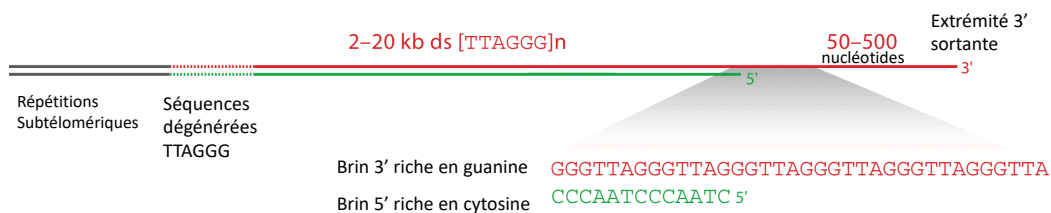


Figure 1 - L'ADN télomérique (modifié de Palm, de Lange T. 2008). L'ADN télomérique est représenté par les deux brins en rouge et vert, il s'agit de séquences nucléotidiques (5'-TTAGGG-3') sur 2000 à 20 000 paires de bases. Le brin en rouge comporte l'extrémité 3' sortante et est riche en guanines, sa longueur peut varier entre 50 et 500 nucléotides. Le brin non-sens en vert est riche en cytosines. Les séquences sous-télomériques sont délimitées des répétitions télomériques 5'-TTAGGG-3' par des séquences télomériques dégénérées.

Le brin d'ADN télomérique comportant l'extrémité 3' sortante résulte du problème de réplication des extrémités des chromosomes. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase et la primase α synthétisent le nouveau brin dans le sens 5'-3' à partir d'amorces d'ARN. Une fois la réplication complète, les amorces d'ARN sont dégradées. Ainsi, après dégradation de l'amorce et à cause de l'orientation opposée des brins parentaux, la synthèse du brin dit retardé (3'-5') formera une extrémité 3' sortante. À chaque division cellulaire, cette extrémité se raccourcit jusqu'à atteindre une limite critique appelée « limite de Hayflick ». Ce raccourcissement a été observé dans une culture cellulaire humaine, *in vitro*, menant à la sénescence réplivative après une cinquantaine de divisions cellulaires (Hayflick, 1965; Shay & Wright, 2000). Enfin, l'extrémité 3' sortante des télomères peut être reconnue comme des cassures d'ADN double-brin et activer les voies de réparation de l'ADN. Pour empêcher l'activation de ces voies, des protéines associées aux télomères formant le complexe *Shelterin* exercent une régulation négative des voies de signalisations ATM et ATR (Tong et al., 2015). L'activation de la voie de signalisation des dommages à l'ADN appelée DDR (en anglais DNA Damage Response) est initiée par deux protéines kinases : ATM (en anglais *ataxia telangiectasia*) et ATR (en anglais *ataxia telangiectasia and Rad 3 related*). Le complexe MRN, qui est composé des protéines MRE11, RAD50 et NSB1, reconnaît les cassures double-brin et permet le recrutement de la kinase ATM qui initie la voie de réparation des dommages à l'ADN. De plus, c'est la présence d'ADN simple brin qui active la voie de signalisation ATR. Les deux protéines kinases ATM et ATR permettent la phosphorylation en cascade de nombreuses protéines cibles (par exemple l'histone H2AX) et a pour conséquences l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de voies de réparation (Palm & de Lange, 2008). Enfin, les télomères peuvent former des structures particulières leur permettant de se protéger afin de ne pas être reconnus comme des cassures dans l'ADN.

1.1.3 Structures formées par les télomères : la boucle T et les G-quadruplexes

Nous avons vu que les télomères sont des séquences répétées nucléotidiques, mais celles-ci sont associées aussi avec des protéines pour former un réel complexe nucléoprotéique : c'est le complexe *Shelterin* (ensemble de 6 protéines télomériques chez l'humain) que nous développerons dans la section suivante.

Ce complexe permet d'arborer une structure secondaire appelée boucle T (boucle Télomérique) rendant le télomère inaccessible aux systèmes tels que la réparation NHEJ (fusion des jonctions non homologues) ou la RH (recombinaison homologue) (de Lange, 2005; Palm & de Lange, 2008) (Figure 2).

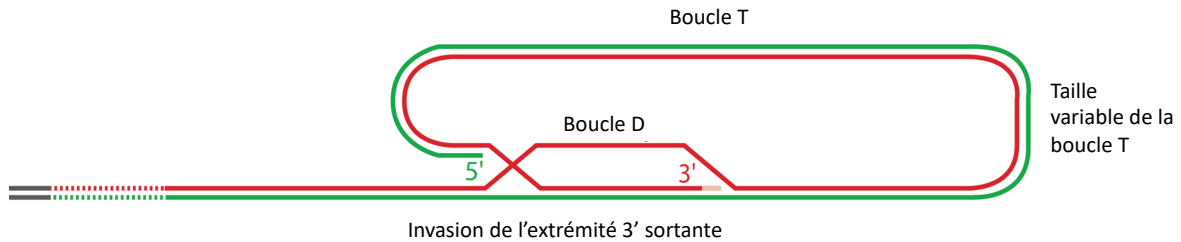


Figure 2 - L'ADN télomérique et la structure de la boucle T (modifié de Palm, de Lange T. 2008). D'après ce modèle, la molécule d'ADN se replie vers l'arrière et l'extrémité simple brin 3' sortante envahit la région double brin afin de former la boucle T de taille variable pour protéger l'extrémité 3' libre des télomères. Le brin riche en guanines (en rouge) s'apparie avec le brin riche en cytosines (en vert) et forment alors la boucle D.

Par ailleurs, d'autres structures ont été décrites au niveau des télomères: les G-quadruplexes (G4) ou quadruplexes de guanines. Il s'agit de structures très stables formées à partir de séquences d'ADN simple brin riches en guanines. Les motifs G-quadruplexes sont formés par l'empilement de tétrades de guanines, constituées de 4 résidus de guanines appariées les unes aux autres par des liaisons de type pont hydrogène (Figure 3). Ces tétrades sont stabilisées par des cations métalliques comme le sodium ou le potassium qui ressort être le plus stabilisant selon l'étude de l'équipe du Dr Charles Bailey (Hardin, Watson, Corregan, & Bailey, 1992).

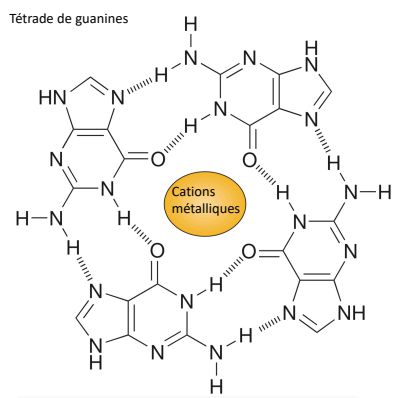


Figure 3 - Tétrade de guanines (modifié de Hansel-Hertsch, Di Antonio et al. 2017). La tétrade de guanines est représentée par l'assemblage des 4 guanines reliées entre elles par 8 ponts hydrogène. Cette structure en tétrade est stabilisée par des cations métalliques (représentés en jaune).

Lorsque l'on rappelle la structure du télomère qui contient un brin d'ADN simple brin à l'extrémité 3' sortante riche en guanines, on imagine alors que ces motifs G-quadruplexes peuvent se former, comme suggéré par plusieurs articles (Neidle & Parkinson, 2003; Burge, Parkinson, Hazel, Todd, & Neidle, 2006). Après la découverte que les télomères pouvaient être transcrits en ARN par l'équipe du Dr. Lingner, d'autres études ont montré l'existence de ces structures G-quadruplexes au sein des ARN produits à partir des télomères (Makarov, Hirose, & Langmore, 1997; Weinrich et al., 1997; Neidle, 2010). En effet, les télomères et les ARNs produits des télomères contiennent des séquences répétées riches en guanines, ces deux derniers peuvent former des structures G-quadruplexes ADN-ARN très stables (Figure 4). Le degré d'intérêt pour ces structures n'a cessé d'augmenter, car les études montrent que les G-quadruplexes ont une capacité à inhiber la télomérase *in vitro* (Zahler, Williamson, Cech, & Prescott, 1991; De Cian et al., 2008).

Ces structures en G-quadruplexes existent *in vivo*, mais elles sont transitoires et peu abondantes. Ainsi, il est difficile de les localiser et de les cibler en conditions physiologiques. Cependant, les techniques d'imagerie utilisant des anticorps spécifiques contre ces structures ont permis leur étude *in vitro* (Schaffitzel et al., 2001; Xu et al., 2012 ; Laguerre, Wong, &

Monchaud, 2016) mais aussi de montrer leur présence en cellules humaines vivantes avec l'utilisation de la microscopie en temps réel et des sondes fluorescentes (Laguerre et al., 2015).

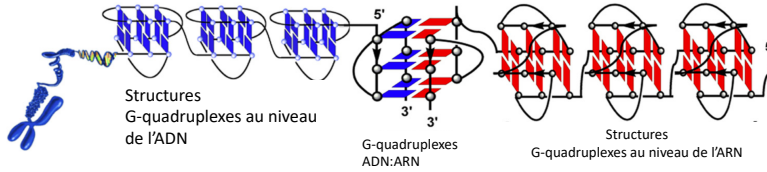


Figure 4 - Schéma des différentes structures G-quadruplexes au niveau de l'ADN, l'ARN ou de complexes ADN : ARN. Les structures G-quadruplexes au niveau de l'ADN sont représentées en bleu et peuvent s'apparier avec les structures G quadruplexes au niveau de l'ARN (représentées en rouge). Ces structures permettent aux télomères de ne pas être reconnus comme des défauts cellulaires (Xu et al., 2012).

De plus, différentes expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont permis d'identifier une nouvelle conformation des structures G-quadruplexes comportant 3 adénines formant une coiffe uniquement présente au sein des cellules humaines (Figure 5) (Dai et al., 2007).

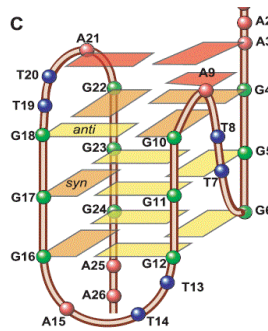


Figure 5 - Topologie unimoléculaire des structures G-quadruplexes humaines (Dai, 2007). L'assemblage des tétrades de guanines est représenté par les rectangles jaunes et orange. On remarque les 3 adénines A21, A9 et A3 formant une coiffe au niveau des structures G-quadruplexes. A= adénine, G= Guanine, T=Thymine, structure établie à partir d'expériences de RMN en solution K^+ (solution finale : 25 mM K^+-PO_4 et 70 mM KCl).

L'étude des G-quadruplexes permet de confirmer que ces structures sont présentes dans les cellules humaines et qu'elles sont perçues comme des "nœuds" au sein de l'ADN télomérique. Leur rôle inhibiteur de l'activité télomérase suggère qu'elles pourraient alors être une cible thérapeutique au sein des cancers. Par ailleurs, en 2015, une étude suggère que les structures G-quadruplexes représentent un site d'interaction pour la télomérase. Un modèle est alors proposé : la télomérase pourrait défaire partiellement ces structures pour maintenir son activité d'élongation (Moye et al., 2015).

Ainsi, les télomères peuvent être protégés par des conformations comme la boucle T ou encore les structures G-quadruplexes permettant la protection de ces extrémités. Néanmoins, d'autres acteurs comme les protéines télomériques interagissent avec les télomères et jouent un rôle protecteur. Le télomère est un complexe nucléoprotéique et un site d'interaction pour les protéines télomériques : c'est le complexe Shelterin.

1.1.4 Les protéines télomériques forment le complexe *shelterin*

Chez l'humain, les télomères sont associés à un ensemble de 6 protéines formant le complexe Shelterin ou télosome. Cette association nucléoprotéique permet la protection des extrémités des chromosomes. En effet, TRF1 et TRF2 (Télomère repeat-binding factor 1 et 2) interagissent directement avec l'ADN double brin tandis que POT1 (Protection of Telomeres 1) interagit avec la partie simple-brin de l'ADN télomérique. TIN2 est en liaison directe avec TPP1, TRF1 et TRF2. TPP1 relie la partie simple brin et la partie double brin des télomères par son interaction avec POT1 et avec TIN2. Enfin, RAP1 est un partenaire constitutif de TRF2 (Giraud-Panis et al., 2013) (Figure 6).

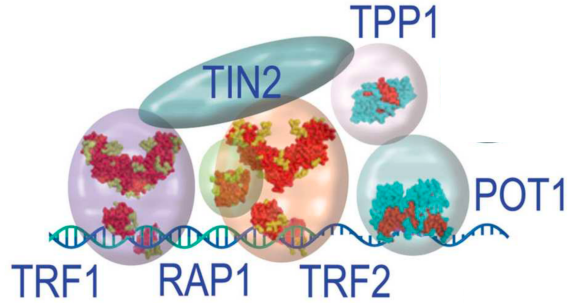


Figure 6 - Représentation schématique du complexe shelterin (modifié de Giraud-Panis, Pisano et al. 2013). Présent chez l'humain, ce complexe ADN-protéine est composé de 6 protéines télomériques : RAP1, TRF2, TRF1, TIN2, POT1, TPP1. On remarque que les protéines TRF1 et TRF2 interagissent directement avec le double brin d'ADN alors que les protéines TIN2 et TPP1 interagissent indirectement avec l'ADN et permettent de faire le lien entre protéines télomériques. On remarque aussi que POT1 interagit avec l'extrémité 3' sortante.

La protéine télomérique TRF2 permet la formation de la boucle T. Le brin 3' sortant est associé au brin 5' complémentaire formant la boucle D (J. D. Griffith et al., 1999; De Lange, 2009). La boucle T permet aux télomères de ne pas être reconnus comme des cassures dans l'ADN et empêche l'activation des systèmes de réparations. Ainsi, une fonction majeure des télomères est le maintien de l'intégrité des extrémités des chromosomes. Enfin, il est à noter que même si les télomères sont protégés et inaccessibles aux protéines impliquées dans les systèmes de réparation, ces extrémités peuvent interagir avec la télomérase afin de pallier à leur raccourcissement naturel (Greider & Blackburn, 1985). Comment la télomérase intervient-elle au niveau des télomères ?

1.2 La télomérase : structure et fonction

Découverte chez le cilié *Tetrahymena thermophila*, la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) composé d'une protéine TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) possédant une activité transcriptase inverse, d'un ARN hTR (human Telomerase RNA ou TERC) qui sert de brin matrice pour l'ajout des répétitions télomériques (Greider & Blackburn,

1985) ainsi que de protéines associées. La télomérase a été identifiée chez l'humain il y a une trentaine d'années et démontre une adaptation du complexe RNP au cours de l'évolution (Beattie, Zhou, Robinson, & Harrington, 1998; Weinrich et al., 1997).

La protéine TERT est constituée d'un domaine N-Terminal relié par un domaine linker à l'anneau TERT. Celui-ci est composé des domaines TRBD (domaine de liaison à haute affinité), RT (reverse transcriptase) et CTE (extension C-terminal). L'analyse *in silico* de la séquence de TERT a permis l'identification de 7 domaines très conservés (T, 1, 2, 3, A, IFD, B, C, D et E) qui constituent le site actif de l'enzyme (Lingner et al., 1997) (Figure 7).

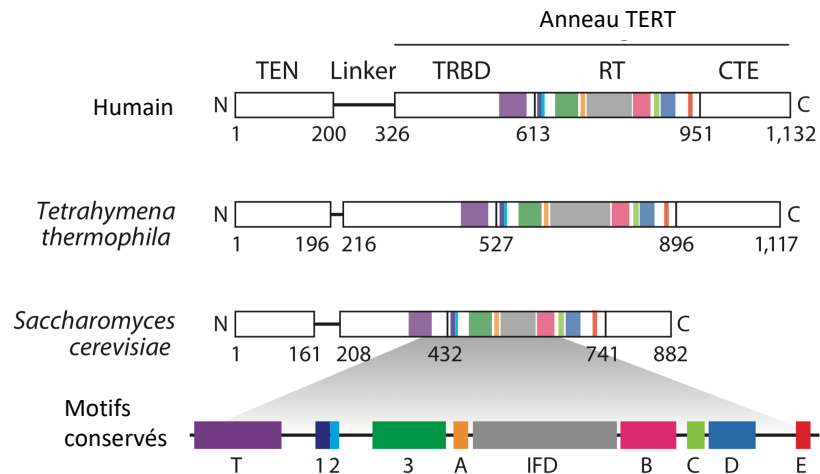


Figure 7 - Schéma de la protéine TERT (modifié de Wu, Upton et al. 2017). La protéine TERT est constituée d'un domaine N-terminal (TEN), d'un domaine linker qui permet de relier le domaine TEN à l'anneau TERT (constitué du domaine TRBD, RT et CTE) ainsi qu'un domaine C-terminal. On remarque que les domaines T, 1, 2, 3, A, IFD, B, C, D et E représentent des motifs conservés à travers différentes espèces telles que l'humain, *Tetrahymena thermophila* (protozoaire) et *Saccharomyces cerevisiae* (levure). La taille de la protéine TERT diffère selon les espèces, chez l'humain celle-ci est de 1132 acides aminés, chez *Tetrahymena thermophila* de 1117 acides aminés et chez *Saccharomyces cerevisiae* de 882 acides aminés.

Chez l'humain, la protéine TERT n'est pas exprimée dans les cellules somatiques alors que l'expression de hTR est ubiquitaire dans ces cellules. Cependant, les cellules souches embryonnaires, les cellules germinales et certaines cellules du système immunitaire, qui nécessitent un fort potentiel prolifératif, expriment la télomérase (Masutomi et al., 2003). De plus, l'expression de TERT est importante pour les cellules cancéreuses puisque l'enzyme est active dans 85% à 90% des cancers et l'expression de la télomérase permet de contourner la sénescence répliative (Shay & Bacchetti, 1997).

L'ARN hTR constitue la sous-unité ribonucléique qui sert de brin matrice à l'ajout de répétitions télomériques par la sous unité catalytique TERT. L'étude de sa structure secondaire a permis de déterminer différentes régions conservées, soit CR1 à CR8 (Régions conservées). CR1 comporte le brin matriciel d'ARN, CR2 et CR3 représentent le pseudo-nœud ou pseudoknot, les régions CR4/CR5 forment une tige boucle permettant l'interaction avec la sous unité catalytique hTERT et les régions CR6/CR8 (Boîte H/ACA) permettent la stabilisation de l'ARN hTR (Legassie & Jarstfer, 2006) (Figure 8).

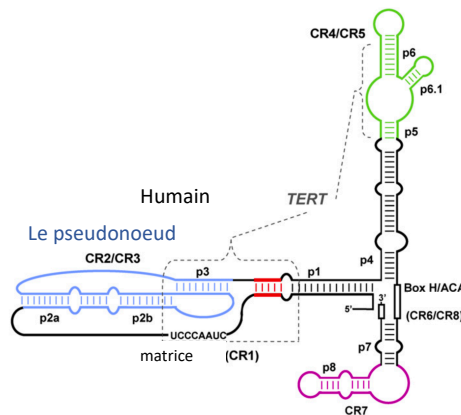


Figure 8 - Structure secondaire de hTR (Legassie, Jarstfer 2006). Chez l'humain, la structure hTR est composée de plusieurs régions conservées (CR1 à CR8). On remarque le brin matrice complémentaire à l'ADN télomérique et localisé en 5' dans la région CR1, la région CR2/CR3 ou pseudo-nœud (représentée en bleu), la forme tige-boucle de la région CR4/CR5 (représentée en vert) qui permet d'interagir avec la sous unité TERT, ainsi que la région CR6/CR8 correspondant à la boîte H/ACA.

L'ARN hTR est associé à plusieurs protéines telles que la dyskérine, conservée au cours de l'évolution et qui se lie à la séquence H/ACA située en 3' de l'ARN hTR. Cette liaison assure la stabilité de l'ARN hTR dans le noyau et supporte l'activité de la télomérase *in vivo*. En effet, la déplétion de la dyskerine engendre une perte d'activité de la télomérase causée par une diminution du niveau de l'ARN hTR, indépendamment du niveau d'expression de TERT (Mitchell, Cheng, & Collins, 1999). La protéine dyskérine est associée à trois autres protéines : GAR1, NOP10 et NHP2 (Figure 9).

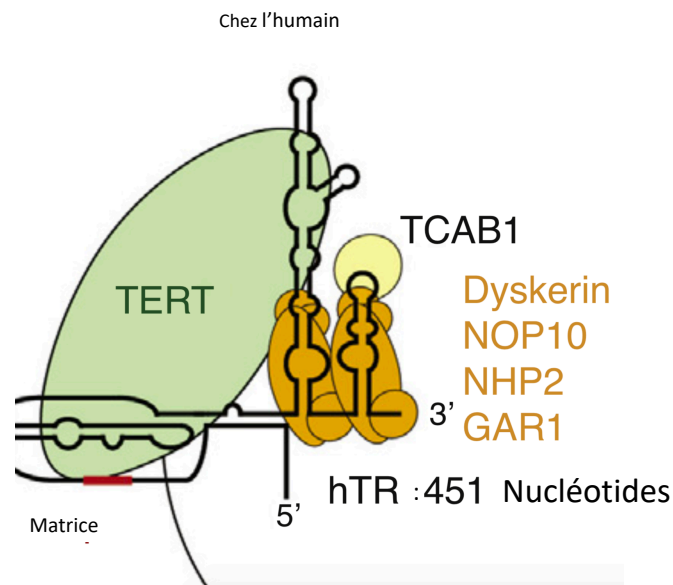


Figure 9 - Structure de la télomérase humaine (Nguyen, Collins et al. 2019). La télomérase humaine est composée de la sous-unité catalytique TERT (représentée en vert), de l'ARN hTR ainsi que des protéines Dyskerin, NOP10, NHP2, GAR1 nécessaires à la maturation et la stabilité de l'ARN de la télomérase. On remarque aussi la protéine TCAB1 (représentée en jaune clair) nécessaire au ciblage de la télomérase aux corps de Cajal.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le raccourcissement des télomères a lieu à chaque division cellulaire jusqu'à un seuil critique qui permet l'entrée de la cellule en sénescence puis

en apoptose. Dans près de 90% des cancers, une réactivation de la télomérase permet de rallonger les télomères indéfiniment, favorisant ainsi l'immortalisation des cellules cancéreuses. On comprend alors que la télomérase est une cible de choix en cancérothérapie. Nous savons que la télomérase possède une activité très spécifique via son interaction brin matriciel – ADN télomérique et la connaissance de sa structure permettrait de développer d'éventuels inhibiteurs thérapeutiques. En effet, un inhibiteur compétitif du brin matriciel de l'ARN hTR comme Imételstat (GRN163L) présenté dans l'étude de l'équipe de Roth en 2010 empêchant la synthèse de nouvelles répétitions télomériques est à considérer (Roth, Harley, & Baerlocher, 2010). Cependant cet inhibiteur est toujours en phase d'essai clinique.

Les télomères représentent une région du génome assez particulière, de par sa structure (boucle T et G-quadruplexes), mais aussi par le fait que les gènes situés dans les régions sous-télomériques sont soumis à l'effet de position télomérique (ou TPE) chez plusieurs eucaryotes. Cette inhibition de la transcription génique dépend de la longueur des télomères et du niveau de compaction de la chromatine (acétylation) (Baur, Zou, Shay, & Wright, 2001). En effet, les modifications épigénétiques comme la méthylation des lysines 9 et 20 de l'histone H3 (H3K9me3; H3K20me3) par les histones méthyltransférases Suv39h1/h2 régulent la longueur des télomères et produisent une chromatine très compacte, favorisant la stabilité des télomères (Flores & Blasco, 2010). Cette région du génome a longtemps été considérée comme silencieuse, c'est-à-dire dépourvue de transcription. Cependant, la découverte de l'ARN non-codant TERRA transcrit à partir des télomères a remis en question ce modèle (Azzalin, Reichenbach et al. 2007).

1.3 Biogenèse de TERRA

1.3.1 Définition

TERRA (TElomic Repeat-containing RNA) est un long ARN non codant transcrit à partir de la région sous-télomérique vers l'extrémité des télomères, caractérisé par des répétitions télomériques UUAGGG à son extrémité 3'. Sa taille est très hétérogène, pouvant aller de 100 pb à 10 kb selon les différents sites d'initiation de transcription dans la région sous-

télomérique. Cette région se trouve en amont des répétitions télomériques et diffère d'un chromosome à l'autre. Ainsi, il est possible de quantifier les ARN TERRA par PCR quantitative issus de chromosomes différents (Porro, Feuerhahn, Reichenbach, & Lingner, 2010). TERRA est transcrit à partir de tous les chromosomes chez les mammifères et est synthétisé uniquement par l'extrémité 5' sortante riche en cytosines (Azzalin, Reichenbach, Khoriauli, Giulotto, & Lingner, 2007) (Luke & Lingner, 2009). Cet ARN est aussi exprimé chez plusieurs organismes et il est conservé: il a été identifié chez la souris, l'humain, la levure et le poisson-zèbre (Porro et al., 2010; Schoeftner & Blasco, 2008; Luke et al., 2008).

Seules les fractions nucléaires contiennent TERRA et ceci a pu être vérifié par hybridation in situ en fluorescence sur cet ARN (RNA-FISH). De plus, cet ARN forme des foci qui colocalisent avec les télomères et interagissent avec quelques protéines du complexe shelterin comme RAP1 et TRF1/2 (Azzalin et al., 2007; Deng, Norseen, Wiedmer, Riethman, & Lieberman, 2009; Luke & Lingner, 2009).

En 2008, les travaux de Blasco et Schoeftner ont permis de montrer que l'ARN polymérase II est responsable, en grande partie, de la transcription des ARN télomériques qui sont caractérisés par les répétitions 5'-UUAGGG-3' (Schoeftner & Blasco, 2008). L'ajout d' α -amanitine, un inhibiteur de l'ARN polymérase II, induit une diminution de la transcription de TERRA comparativement au contrôle ARNr 28 S, transcrit par l'ARN polymérase I. TERRA présente des modifications post-transcriptionnelles comme pour les ARN codants. Seulement 7% de la population de TERRA est polyadénylée (poly A+) dans les cellules HeLa (Azzalin & Lingner, 2008). Cette population polyadénylée est plus stable que la population non-polyadénylée (demi-vie de 8h et 3h, respectivement) et est retrouvée dans le nucléoplasme (Porro et al., 2010). De plus, TERRA possède aussi une coiffe méthyle-7 guanosine en 5' (Porro et al., 2010). Comparativement aux ARN polyadénylés, les molécules de TERRA non-polyadénylées sont associées à la chromatine (Feuerhahn, Iglesias, Panza, Porro, & Lingner, 2010) (Figure 10).

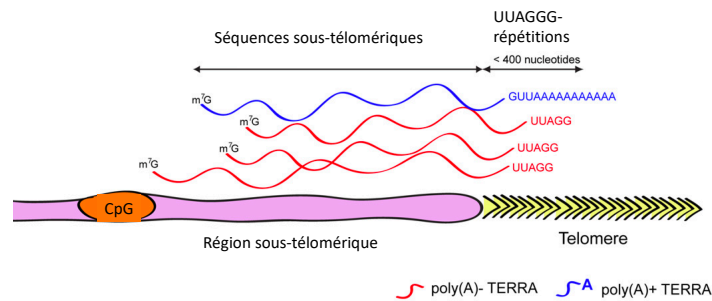


Figure 10 - Biogénèse de TERRA (modifié de Feuerhahn et al, 2010). La transcription de TERRA commence au niveau de la région sous télomérique (représentée en violet) c'est niveau de la région sous télomérique que l'on trouve le site d'initiation de la transcription pourvu d'îlots CpG (représentés en orange). La région sous-télomérique se situe en amont du télomère (représenté en jaune). Les molécules d'ARN TERRA sont représentées en rouge et bleu, celles-ci sont polyadénylées ou non (majoritairement non polyadénylées) et possèdent une coiffe guanosine méthylée en 5'.

TERRA pourrait jouer différents rôles selon qu'il est associé à la chromatine ou libre dans le nucléoplasme. Par ailleurs, il est notable que la majorité des ARN TERRA (environ 90%) qui sont associés à la chromatine pourraient avoir une fonction de régulateur génique ou épigénétique. Actuellement, il existe une controverse sur le transcriptome télomérique, car plusieurs études rapportent que l'expression de TERRA diffère selon le type cellulaire ou le chromosome responsable de la transcription de cet ARN (détails ci-dessous) (Feretzaki, Renck Nunes, & Lingner, 2019b). D'une part, des études ont montré que TERRA peut être généré à partir de certains télomères qui permettraient une transcription plus importante de cet ARN, mais ceci a été contredit par d'autres travaux (Lopez de Silanes et al., 2014; Liu et al., 2019) (voir détails section 1.3.2). D'autre part, TERRA ne serait pas le seul ARN non codant transcrit à partir des télomères puisque chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, des ARN non codants sous-télomériques appelés ARRET, ARIA et α ARRET ont aussi été détectés (Azzalin

& Lingner, 2015). Cependant, ces populations d'ARN n'ont pas été détectées dans les cellules de mammifères.

Ce qui rend l'étude de TERRA complexe est la diversité des résultats sur son expression. En effet, même si celle-ci est reliée aux phénotypes cancéreux (cellules de cancer de l'estomac, du poumon et des ovaires) qui montrent une surexpression par rapport aux cellules non-cancéreuses, les cellules de cancer de l'estomac expriment plus TERRA que les autres cancers nommés précédemment (Deng, Wang, Xiang, et al., 2012). Cette variation existe aussi entre des cellules de cancer télomérase positive et les cellules ALT ou élongation alternative des télomères, qui dépendent de la recombinaison aux télomères (Bryan & Reddel, 1997). Ainsi, il est important de développer de nouvelles approches pour étudier l'expression de TERRA dans différents modèles cellulaires.

1.3.2 Expression de TERRA

Bien qu'il ait été rapporté que les molécules d'ARN TERRA soient transcrites à partir de tous les télomères chez les mammifères, certaines études suggèrent que l'origine de l'expression de la population TERRA serait dû à un seul télomère préférentiel. Il semblerait que, chez la souris, la principale source de TERRA proviendrait du télomère 18q (Lopez de Silanes et al., 2014). Cependant, cette étude est fondée sur un transcrit qui ressemble à TERRA (répétitions télomériques identiques, partenaires protéiques identiques) dans les cellules pluripotentes embryonnaires de souris. Une autre étude a mis en évidence un site préférentiel de transcription, comme le télomère 20q chez l'humain dans ces cellules U2OS (cellules épithéliales provenant d'un ostéosarcome, cellules ALT) (Montero, Lopez de Silanes, Grana, & Blasco, 2016). En effet, ces résultats montrent que la délétion de la région sous-télomérique 20q par CRISPR-Cas9 cause une diminution sévère de la population totale de TERRA par RNA-FISH. D'autres groupes de recherche ont montré que l'expression de TERRA serait un produit de transcription de plusieurs télomères (1p, 9p, 12p, 16p...), comme le montre l'étude du laboratoire Lingner en utilisant des cellules HeLa, U2OS et HCT (cellules de cancer du côlon) (Feretzaki et al., 2019b; Porro, Feuerhahn, Delafontaine, et al., 2014).

Ces résultats conflictuels montrent la nécessité de poursuivre les études sur l'expression de l'ARN TERRA et la difficulté à émettre des généralités puisque ces études utilisent des types

cellulaires différents (cellules ALT, cellules télomérase positives). En effet, TERRA est plus exprimé dans les cellules ALT que les cellules télomérase positive (Azzalin et al., 2007; Deng, Wang, Xiang, et al., 2012; Arora et al., 2014).

En 2017, l'équipe de Jeannie T. Lee a révélé de nouveaux sites génomiques pouvant être liés par l'ARN TERRA comme les régions des chromosomes sexuels pseudo-autosomales. De plus, cette même équipe de recherche a mis en évidence des séquences intrachromosomales similaires aux séquences télomériques chez la souris (Chu et al., 2017). Ces séquences permettraient de lier les ARN TERRA, mais pourraient être aussi potentiellement des sites de transcription d'ARN similaire à TERRA, appelé PAR-TERRA (Chu et al., 2017).

Enfin, en 2019, une étude a utilisé la RT-PCR quantitative pour montrer que la transcription de l'ARN TERRA est produite à partir de plusieurs télomères et que cette expression varie au sein de différents modèles cellulaires humains (fibroblaste, cellule télomérase négative-ALT ou cellule télomérase positive) (Feretzaki, Renck Nunes, & Lingner, 2019a). De plus, cette étude rapporte que l'expression de l'ARN TERRA serait soumise à deux types de promoteurs : un type de promoteur pourvu d'ilots CpG et un autre type de promoteur dépourvu d'ilots CpG. Les ilots CpG peuvent être modifiés par des ADN méthyl transférases, ce qui permet d'inhiber la transcription de TERRA. Cette étude indique que la population globale de l'ARN TERRA n'est pas uniquement produite à partir du télomère 20q dans les cellules humaines. Enfin, si TERRA est exprimé suite au raccourcissement des télomères chez la levure *S. cerevisiae*, ceci n'est pas valable chez tous les organismes puisque cette corrélation est moins évidente chez la souris et l'humain (Cusanelli, Romero, & Chartrand, 2013) (Smirnova et al., 2013). Les télomères qui expriment le plus de molécules d'ARN TERRA ne sont pas des télomères plus courts que ceux qui en expriment moins (Feretzaki et al., 2019a).

Aussi, la transcription de TERRA pourrait être contrôlée par différents facteurs de transcription à doigt de zinc comme ZNF148, ZFX, ERG1 et PLAG1 (Feretzaki et al., 2019a). Ceci expliquerait alors la variabilité d'expression d'un tel ARN au sein des différents modèles cellulaires. Autrement dit, même si TERRA semble être conservé à travers les espèces, son expression peut varier au sein de ces espèces.

1.4. Régulation de TERRA

1.4.1 Régulation de TERRA au cours du développement

Durant le développement de la souris, TERRA n'est pas exprimé au cours des stades embryonnaires E11.5 -15.5 (par hybridation de type Northern sur des embryons de souris). Par contre, TERRA est détecté par hybridation *in situ* au stade E16.5 dans les cellules souches de souris et dès ce stade on remarque que TERRA est localisé au niveau du noyau (Schoeftner & Blasco, 2008; Chu et al., 2017). Pour développer l'étude de la régulation de TERRA, l'équipe de Paula Cohen a montré que TERRA est exprimé de façon croissante au cours des stades embryonnaires dans les cellules germinales primordiales comparativement aux cellules somatiques en utilisant la technique d'hybridation *in situ*. De plus, cette expression est plus importante dans les cellules germinales primordiales issues des gonades femelles de souris (Brieno-Enriquez, Moak, Abud-Flores, & Cohen, 2019). Ceci suggère que TERRA est localisé dans les gonades et que son expression dépend du stade embryonnaire ainsi que du sexe chez la souris. Dans les cellules souches embryonnaires humaines, c'est-à-dire non différenciées, TERRA est associé aux deux chromosomes sexuels alors qu'après la différenciation cellulaire, cet ARN se retrouve associé à un des deux chromosomes sexuels. Par ailleurs, dans les cellules souches de sexe féminin, TERRA est associé aux deux chromosomes X. Pendant la différenciation, TERRA ne reste associé qu'au génotype (X,Y) (Zhang et al., 2009). Ceci montre que TERRA change d'expression et de localisation au cours du développement.

TERRA n'est pas seulement régulé au cours du développement embryonnaire, mais aussi tout au long du cycle cellulaire. Pour étudier l'expression de TERRA au cours du cycle cellulaire, des cellules HeLa ont été synchronisées à la transition G1/S avec double traitement à la thymidine puis l'expression de TERRA (transcrit à partir des télomères 10, 15, Xp/Yp, Xq/Yq ; p= bras court, q=bras long) a été analysée par RT-qPCR. L'expression de TERRA est très active en fin de phase G1, faible en phase S et atteint un minimum d'expression à la transition S/G2. Enfin, le niveau de TERRA est rétabli et atteint un maximum en mitose. L'expression de TERRA est donc régulée au cours du cycle cellulaire (Feuerhahn et al., 2010) (Figure 11).

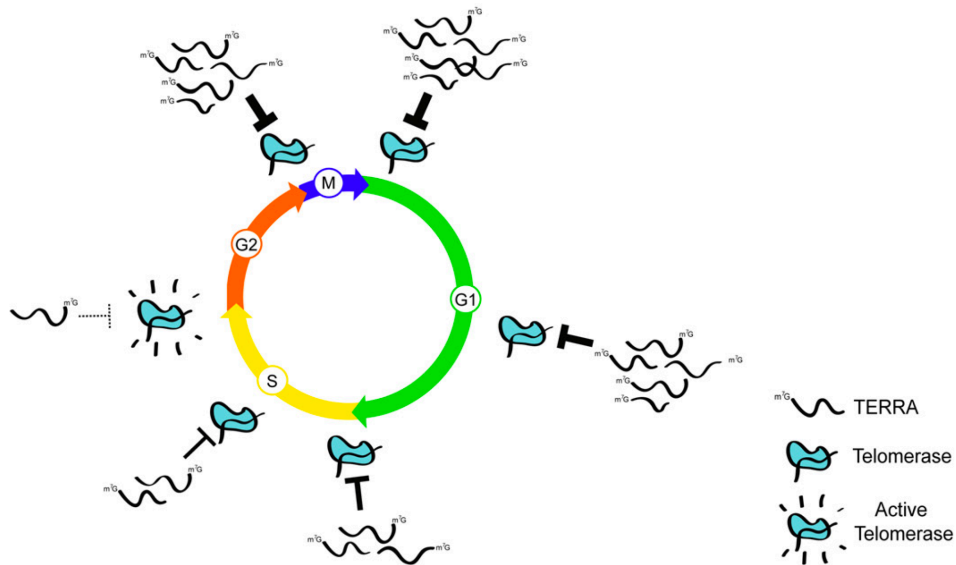


Figure 11 - TERRA est régulé au cours du cycle cellulaire (modifié de Feuerhahn, 2010). On retrouve les différentes phases du cycle cellulaire (G1 en vert, S en en jaune, G2 en orange et M en bleu). On remarque que l'expression de TERRA varie au cours de ce cycle, les molécules de TERRA sont représentées en noir. Le niveau d'expression de TERRA est le plus faible en fin de phase S et en début de phase G2 c'est-à-dire lorsque la télomérase est active. Au sein de ce modèle de régulation, TERRA inhibe l'activité de la télomérase en mitose et en phase G1.

De plus, cette régulation semble être conservée à travers les espèces puisque, chez la levure, le niveau de TERRA diminue au cours de la phase S pendant que l'expression de l'ADN polymérase ϵ est plus importante (Graf et al., 2017). Ceci suggère qu'il existe une corrélation entre le niveau de TERRA et la réplication de l'ADN durant la phase S. Cette régulation au cours du cycle cellulaire laisse penser que TERRA interagit avec d'autres facteurs comme les facteurs épigénétiques qui ont rôle dans la modulation de l'état de la chromatine.

1.4.2 Régulation de TERRA par les facteurs épigénétiques

Le niveau d'expression de TERRA dépend du niveau de compaction de la chromatine. En effet, l'ajout de trichostatin A, un inhibiteur de désacétylase d'histone, au sein de lignées HeLa induit une augmentation du niveau d'expression de TERRA (Azzalin & Lingner, 2008). La chromatine

acétylée est plus accessible aux ARN polymérases pour la transcription. De plus, la triméthylation des lysines 9 et 20 des histones (H3K9me3 et H4K20me3) et la présence de HP1 (Heterochromatin Proteine 1) au niveau de la région sous-télomérique témoignent d'une zone d'hétérochromatine (Schoeftner & Blasco, 2010). En 2012, Arnoult et ses collègues ont montré que TERRA, dans les cellules humaines, est plus exprimé au niveau des chromosomes qui présentent un faible pourcentage de méthylation au niveau de leurs promoteurs (îlots de dinucléotides cytosine-guanosine ou CpG). Ils ont aussi remarqué qu'un enrichissement de H3K9me3 au niveau des longs télomères induit une inhibition de l'expression de TERRA. De plus, les méthyltransférases SUV39h1/h2 ainsi que la protéine HP1 α , liant la chromatine, sont impliqués dans la régulation de TERRA. En effet, la déplétion de ces protéines induit une augmentation de TERRA au sein de trois types cellulaires utilisés (HT1080 fibrosarcome, HCA2 fibroblaste non tumorale et LB37 cellules cancéreuses pulmonaires) (Arnoult, Van Beneden, & Decottignies, 2012). Le fait que TERRA soit associé aux facteurs épigénétiques comme HP1 α (par expérience d'immunoprécipitation d'ARN) et H3K9me3 laisse penser que TERRA régule négativement sa propre expression (Deng et al., 2009; Arnoult et al., 2012).

L'équipe de recherche de Sara Selig a mené plusieurs travaux sur les patients pour lesquels on détecte une mutation au sein du gène DNMT3, responsable de l'immunodéficience combinée, de l'instabilité de l'hétérochromatine paracentromérique et de dysmorphie faciale (patients ICF). Les études ont montré que TERRA est surexprimé de façon anormale dans ces cellules comparativement aux autres ARN cellulaires. De plus, la région sous-télomérique est hypométhylée chez ces patients et leurs télomères sont anormalement courts (Yehezkel, Segev, Viegas-Pequignot, Skorecki, & Selig, 2008). En 2014, une autre étude a montré que lorsque les cellules ICF sont reprogrammées en cellules iPSCs (induced pluripotent stem cells), les niveaux de TERRA restent anormalement élevés alors que les télomères sont normalement rallongés. Ceci suggère que TERRA ne serait pas surexprimé uniquement dans le cas de télomères courts (Cusanelli et al., 2013). Le fait que le niveau de TERRA soit surexprimé suggère qu'il jouerait un rôle au sein de cette maladie (Sagie et al., 2014). Il a été montré quelques années plus tard, que TERRA effectue de nombreuses interactions au niveau des télomères formant des hybrides ARN:ADN, ou boucles R, au sein des cellules ICF et que l'accumulation de ces derniers provoquait des anomalies au niveau des télomères (Sagie et al., 2017). Enfin, d'autres facteurs

peuvent être à l'origine de la régulation de l'expression de TERRA comme le facteur de transcription CTCF ou encore la cohésine. Effectivement, le facteur CTCF permet de recruter l'ARN polymérase II au niveau sous-télomérique du promoteur TERRA (Deng, Wang, Stong, et al., 2012). De plus, il a été montré que lorsque ce facteur est muté, cela engendre une régulation négative de la transcription de TERRA ainsi qu'un impact sur l'efficacité de la réplication de l'ADN (Deng, Wang, Stong, et al., 2012). Tous ces résultats montrent que l'expression de TERRA est régulée par de nombreux facteurs épigénétiques et que sa surexpression peut être impliquée dans des maladies comme l'ICF.

1.5 Régulateurs protéiques de TERRA

TERRA possède un interactome important et ces différentes interactions sont souvent responsable de sa propre régulation. Premièrement, une étude a montré que TERRA serait régulé par les protéines impliquées dans la voie de dégradation des ARN non-sens comme UPF1, EST1 et SMG1. En effet, après délétion de ces protéines, un nombre de foci d'ARN TERRA plus important a été observé comparativement aux cellules qui ne sont pas déplétées pour ces protéines (Azzalin et al., 2007). Comme TERRA interagit avec les télomères, les chercheurs se sont intéressés à savoir si les protéines télomériques comme TRF1 ou TRF2 agissaient comme régulateurs de l'ARN TERRA. En effet, la déplétion de TRF1 montre une diminution drastique de l'expression de TERRA au sein de cellules embryonnaires humaines et de souris. De plus, TRF1 interagit avec l'ARN polymérase II qui est responsable de la synthèse de TERRA. Ainsi, TRF1 aurait alors un rôle co-transcriptionnel (Schoeftner & Blasco, 2008).

Par ailleurs, certaines études montrent que TRF2 est aussi un régulateur de l'expression de TERRA. En effet, dans les cellules HeLa, lorsque TRF2 est délété, on observe un accroissement de l'expression de TERRA alors que la déplétion d'autres protéines télomériques comme POT1 n'a aucun effet sur l'expression de cet ARN (Porro, Feuerhahn, Delafontaine, et al., 2014). Enfin, des protéines comme ATRX, modulateur de chromatine et hélicase, régule négativement l'expression de TERRA. Cependant, cette régulation est réciproque, car la déplétion de TERRA montre aussi une augmentation de l'expression de ATRX (Chu et al., 2017). Plus récemment, Snail 1, un facteur de transcription impliqué dans la transition épithelio-

mésenchymateuse (phénotype souvent associé aux cellules cancéreuses), a été montré comme inhibiteur de TERRA. En effet, la déplétion de Snail 1 induit une expression de TERRA au moins deux fois plus importante par rapport au contrôle dans les cellules souches embryonnaires et de cancer CAFs (Cancer Associated Fibroblast) (Mazzolini et al., 2017). De plus, l'expression de TERRA serait régulée par des facteurs de transcription tels que ZNF148, ZFX, EGR1 et PLAG1. Ces derniers font partie de la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc et sont tous impliqués dans la régulation négative de l'expression de l'ARN TERRA. Lorsque ces facteurs sont déplétés dans les cellules des patients ICF, le niveau d'expression de TERRA est augmenté (Feretzaki et al., 2019a). Si ces mécanismes de régulation sont plutôt classiques puisque la délétion d'un facteur engendre une conséquence directe sur l'expression de TERRA, un autre mode de sa régulation qui dépend de la longueur des télomères est moins évident, étant donné la diversité des résultats rapportées dans les études développées ci-dessous.

1.6 Régulation de TERRA par la longueur des télomères

Une étude montre que le niveau d'expression de TERRA est réduit au sein de cellules embryonnaires immortalisées dans lesquelles l'activité télomérase est inhibée (tert^{-/-}) comparativement au contrôle (cellules immortalisées tert^{+/+}). Ces cellules se divisent au cours du temps et la longueur de leurs télomères diminuent. Les chercheurs de cette même étude montrent que l'expression de l'ARN TERRA est réduite jusqu'à un certain seuil puis reste constante au sein des cellules tert^{-/-} (Schoeftner & Blasco, 2008). Ceci suggère que l'expression de TERRA est régulée en partie par la longueur des télomères et qu'il existe d'autres mécanismes régulant la transcription de l'ARN TERRA (Schoeftner, Blasco 2008). Par ailleurs, de nombreuses études chez la levure ont été réalisées et permettent de comparer la régulation de TERRA avec les mammifères. Par RT-qPCR, il a été montré que les molécules d'ARN TERRA sont exprimées à partir des télomères courts et permettraient le recrutement de la télomérase aux télomères, formant des foci de télomérase nommés T-Recs, comme montré par imagerie en cellules vivantes de levures (Cusanelli et al., 2013). Chez la levure, on arrive à comprendre que TERRA est régulé par la longueur des télomères. Cependant, ceci est moins évident chez les mammifères.

D'autres études montrent qu'au sein de lignées cellulaires spécifiques, comme les cellules HT1080, HCA2 et LB37, l'expression de TERRA serait inversement corrélée avec la longueur des télomères (Arnoult et al., 2012). En effet, plus les télomères sont longs et moins TERRA est exprimé en raison de l'importance de la protéine HP1 et des marques d'histones méthylées H3K9me3, rendant alors l'état de la chromatine très condensée qui n'est pas favorable à la transcription de TERRA. Cependant, d'autres études montrent qu'il n'y aurait pas de corrélation entre l'expression de TERRA et la longueur des télomères au sein de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines (cancer du sein, gastriques, cellules de la peau immortalisées...) (Smirnova et al., 2013). En effet, au cours de cette dernière étude, la surexpression de la télomérase qui permet de rallonger la longueur des télomères n'induit aucun changement sur l'expression de TERRA dans les cellules HeLa (Smirnova et al., 2013). Ainsi, ces études qui se contredisent ne permettent pas de trancher sur la corrélation directe de la régulation de TERRA et la longueur des télomères chez les mammifères.

L'étude de TERRA est complexe étant donné que son expression diffère selon le type cellulaire et l'organisme étudié d'une part, mais aussi car sa régulation est dépendante de plusieurs facteurs qui empêche d'attribuer un rôle précis à TERRA d'autre part.

1.7 Le protéome associé à TERRA et ses fonctions

1.7.1 Le protéome associé à TERRA

Afin de développer les connaissances sur l'ARN TERRA, l'étude des interactions TERRA-protéines permet d'identifier les rôles de cet ARN ainsi que de comprendre sa régulation. Ces interactions ont pu être mises en évidence grâce aux techniques d'enrichissement d'ARN (RNA pull down), de l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ou encore de la méthode d'étude quantitative SILAC qui permet d'identifier de nombreux partenaires protéiques.

En 2009, l'équipe du Dr Paul Lieberman a montré que TERRA interagit avec les protéines du complexe shelterin comme TRF1 et TRF2 via son domaine GAR, mais aussi avec les protéines ORC, HP1 et H3K9me3 (Deng et al., 2009). La découverte de ces interactions a permis

d'identifier les différents rôles de TERRA comme le recrutement de la protéine ORC, complexe protéique lié à l'ADN qui reconnaît le site initiateur de la réplication de l'ADN, au niveau des télomères afin de maintenir leur structure. Une autre étude a permis de révéler que TERRA interagit aussi avec des protéines liants l'ARN (RBPs). En effet, TERRA interagit avec les protéines de la famille hnRNP, *in vitro* et *in vivo*, comme hnRNP-A1, A2B1, F et M, mais celles qui sont les plus abondantes sont les protéines hnRNP-A1, F et M (Deng et al., 2009). L'utilisation de la méthode quantitative SILAC a permis d'identifier de nombreux partenaires protéiques et de montrer que les interactions TERRA-hnRNP décrites dans l'article de (Deng et al., 2009) ne semblent pas être spécifiques (Scheibe et al., 2013). L'étude de l'équipe de recherche de Matthias Mann a identifié 115 protéines pouvant interagir avec l'ARN TERRA. Les interactions TERRA – SWI et SNF (remodelleur de chromatine), TERRA-protéine EXOs (protéines de l'exosome) ou encore avec les ARN polymérase font parties des interactions majeures mises en évidence dans cet article (Scheibe et al., 2013). En 2017, la technique iDRIP qui permet de fixer les cellules, récupérer les noyaux, isoler la chromatine, cibler les complexes TERRA – protéines par des billes greffées des séquences complémentaires à TERRA. Après élution des complexes TERRA : protéines, l'utilisation de la spectrométrie de masse a permis d'identifier plusieurs partenaires *in vivo* notamment les protéines du cycle cellulaire ou encore de la matrice nucléaire, mais cette étude a montré que ATRX est un interactant majeur de TERRA (Chu et al., 2017). Il a aussi été montré que TERRA peut interagir avec la télomérase *in vitro* (Redon, Reichenbach, & Lingner, 2010). Les nombreuses études décrites précédemment nous permettent de comprendre que TERRA interagit avec de nombreux facteurs. Ces nombreuses interactions laissent sous-entendre que TERRA n'a pas une seule fonction, mais plusieurs à l'échelle cellulaire.

TERRA lie aussi des protéines qui lui permet de réguler son activité. En effet, les protéines NONO, SFPQ ainsi que FUS ont été récemment découvertes comme interactantes de cet ARN. Ces protéines ont plusieurs rôles notamment la suppression des hybrides ARN : ADN pour assurer la stabilité et l'intégrité du génome (Petti et al., 2019). La mise en évidence de ces interactions a permis d'identifier, notamment, les différents rôles de TERRA. Étant donné que TERRA est transcrit au niveau des télomères qui ont besoin d'être protégés dans la cellule, les études ont montré que TERRA participait à la fonction de protection du génome. Il est donc

important de mieux comprendre les mécanismes qui permettent ce maintien de l'intégrité du génome.

1.7.2 TERRA et l'intégrité du génome

TERRA interagit avec les télomères en formant des hybrides ARN-ADN et des boucles nommées R-Loop (RNA-Loop) (Pfeiffer, Crittin, Grolimund, & Lingner, 2013) (Figure 12).

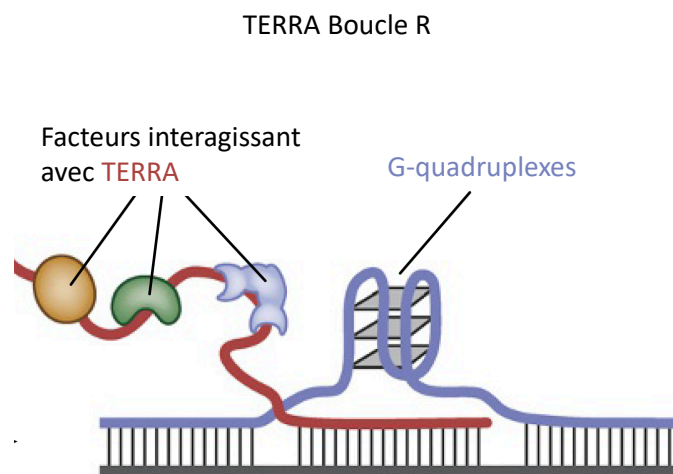


Figure 12 - Schéma des boucles R formées par TERRA au niveau des télomères (modifié de Rippe et Luke, 2015). Ces boucles sont formées par l'interaction entre l'ARN (TERRA) et de l'ADN (télomère). Un des brins d'ADN devient libre (en bleu) et forme la structure G-quadruplexe (représentée en bleu) décrite précédemment. TERRA (représenté en rouge) pourrait interagir avec l'ADN télomérique et ses partenaires protéiques en même temps (représentés en jaune, vert et bleu).

La formation de ces interactions permet une protection de l'extrémité 3' sortante de l'ADN télomérique des exonucléases ou des systèmes de réparation de l'ADN. En effet, ces structures favorisent la recombinaison homologe et celle-ci est inhibée par la présence de RNase H1, ciblant les structures hybrides ARN TERRA-ADN télomérique (Arora et al., 2014). Le fait que TERRA soit un ARN conservé au sein des espèces permet de mettre en évidence

ces structures chez d'autres organismes que l'humain afin de comprendre cette fonction de protection du génome. En effet, ces hybrides ARN:ADN sont retrouvés aussi bien chez l'humain que chez la levure (Yu, Kao, & Lin, 2014). TERRA joue un rôle protecteur du génome de par les structures formées avec l'ADN télomérique, il s'agit d'un mécanisme physique. Cependant, il existe aussi un niveau de protection de TERRA au niveau biologique. Quels sont les facteurs biologiques impliqués dans la protection du génome?

Chez la levure, il a été montré qu'en absence de la télomérase, ces R-loops étaient nombreuses aux télomères courts (Graf et al., 2017) et un phénomène similaire est retrouvé chez l'humain, au sein des cellules ALT (déficiente pour la télomérase). En effet, la télomérase aurait un rôle inhibiteur de la formation des structures boucles R. Ceci peut se comprendre puisque lorsque la télomérase est active, celle-ci nécessite l'extrémité 3' sortante libre des télomères pour exercer son activité processive afin d'assurer leur élongation.

Si TERRA est impliqué dans la protection du génome, des cassures au niveau de l'ADN devraient avoir une conséquence sur le niveau d'expression de cet ARN. Effectivement, en 2014, Porro et ses collègues ont montré que l'ajout de zeocin, un agent induisant des cassures double brin dans l'ADN, et la délétion de TRF2 dans des cellules HeLa induisaient une augmentation de la transcription de TERRA au cours du temps (Porro, Feuerhahn, Delafontaine, et al., 2014). Ceci confirme alors la fonction de protection des télomères par les protéines télomériques (complexe shelterin). Cependant, peut-on faire le lien inversement entre le niveau d'expression de TERRA et l'apparition de cassures double brin ou défauts au niveau de l'ADN?

La première délétion génétique de TERRA par le système CRISPR/Cas9 a été réalisée en cellules humaines (Montero et al., 2016). Une délétion de la région sous-télomérique du télomère 20q dans des cellules U2OS a permis de confirmer le rôle protecteur de TERRA dans l'intégrité des télomères. Cette délétion induit un raccourcissement important des télomères et des dommages à l'ADN visibles sous forme de foci γ H2AX. On comprend que TERRA joue un rôle protecteur aussi bien dans les cellules télomérase positives (HeLa) que dans les cellules ALT. L'étude chez la souris permet de soutenir cette fonction protectrice. En effet, la délétion de TERRA dans les cellules embryonnaires de souris entraîne aussi une accumulation de foci

γ H2AX, marqueur des cassures double brin, des fusions de chromatides sœurs et des insertions chromosomiques au niveau des télomères, suggérant que TERRA aurait un rôle protecteur et permettrait le maintien de l'intégrité des télomères chez les mammifères (Chu et al., 2017).

On comprend alors que l'absence de TERRA induit des défauts au sein de l'ADN et que l'induction de cassures double brin permet l'augmentation du niveau d'expression de TERRA. Cependant, chez la levure, les travaux de Brian Luke et ses collègues ont montré que la formation de boucles R avec TERRA induit la réponse aux dommages à l'ADN (Damage DNA Response, DDR) permettant le recrutement de Rad51 et du complexe MRX, alors que la dégradation de TERRA et des boucles R ne permet pas la mise en place de la réponse aux dommages à l'ADN aux télomères (Graf et al., 2017).

Est-ce que TERRA favorise la protection des télomères contre la reconnaissance aux systèmes de réparation ou est ce qu'il favorise l'activation des systèmes de réparation de l'ADN? Il est difficile d'attribuer un seul rôle précis pour TERRA puisque cet ARN contribue à la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) de par son interaction avec LSD1 (Lysine deméthylase 1) dans des cellules HeLa déplétées pour TRF2. LSD1 permet le recrutement du complexe MRX qui joue le rôle de senseur aux dommages liés à l'ADN (Porro, Feuerhahn, & Lingner, 2014). TERRA interagit avec des protéines afin d'y jouer un rôle dans la protection du génome, mais cet ARN interagit aussi avec l'ADN et contribue à la régulation de la chromatine.

1.7.3 TERRA et la régulation de la chromatine

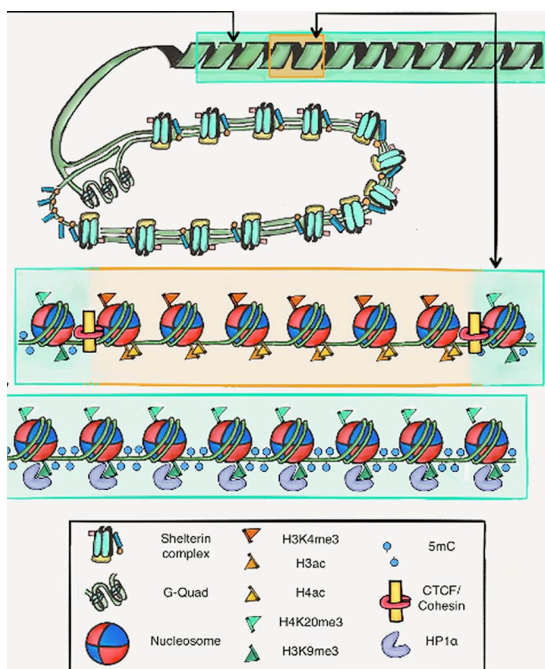
D'une part TERRA interagit avec l'ADN télomérique et d'autre part avec des séquences extra-télomériques. Les interactions avec les télomères forment des hybrides ADN : ARN qui prennent la forme de boucles, les boucles R, formées par des structures G-quadruplexes TRF2-dépendantes (O. W. Griffith, 1999; Doksani, Wu, de Lange, & Zhuang, 2013). TERRA interagit avec des facteurs régulant l'hétérochromatine tels que les histones méthyltransférase Suv39h1, la protéine HP1 et l'histone H3K9me3 ainsi que le complexe PRC2 via les sous-unités EZH2 et SUZ12 (Wang et al., 2017). Ces interactions laissent sous-entendre que TERRA aurait un rôle régulateur au niveau de la chromatine. Par conséquent, TERRA pourrait agir comme régulateur de l'expression génique. En effet, lorsque l'équipe de Jeannie Lee a déplété TERRA par la

méthode d'oligonucléotides antisense (ASO), l'expression de plusieurs gènes comme *Tmx3*, *Mid1*, *Erdr1* et *WIs* fut dérégulée (Chu et al., 2017). Plusieurs de ces gènes sont associés à la voie de régulation de TOR et à la régulation de la transcription. De plus, cette même étude montre que la majorité des sites avec lesquels TERRA interagit sont extra-téломériques. En effet, TERRA lie des régions intrachromosomales comportant des répétitions télomériques qui représentent 21% des interactions TERRA avec le génome (Chu et al., 2017).

TERRA est aussi libre dans le nucléoplasme pour y jouer un rôle trans-régulateur. En effet, Mazzolini et ses collègues ont montré que la répression de TERRA est essentielle pour la régulation des gènes requis pour la transition épithelio-mésenchymateuse tel que le gène codant pour la fibronectine (protéine de la matrice extracellulaire) ou alors la E-cadhérine permettant d'effectuer les jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Mazzolini et al., 2017).

D'après ces résultats, il apparaît que TERRA est à la fois un facteur *cis* et *trans*-régulateur effectuant diverses interactions protéiques (Oliva-Rico & Herrera, 2017) (Figure 13).

A)



B)

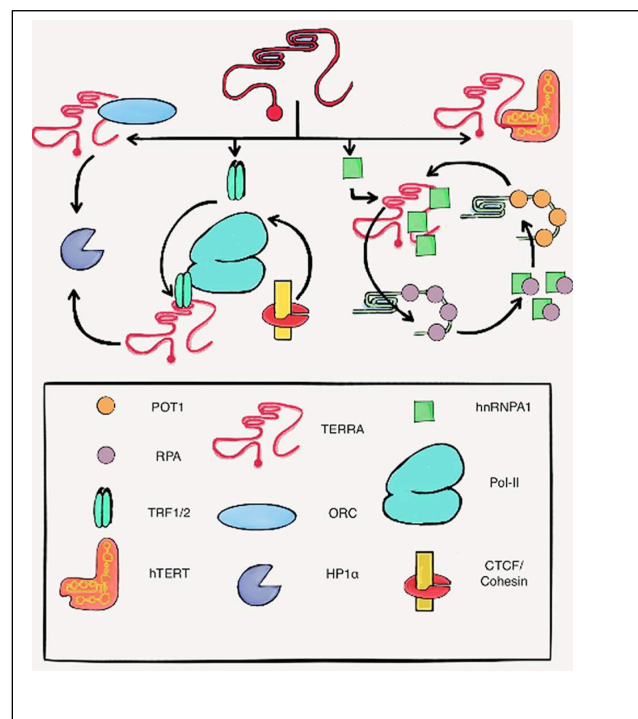


Figure 13 - Représentation de la chromatine au niveau sous-téломérique/téломérique et les interactions TERRA : protéines (Olivia-Rico, Herrera, 2017).

A) La région télomérique forme une boucle T stabilisée par le complexe shelterin. Le cadre en jaune, délimité par le complexe CTCF/Cohésin, représente une région active de transcription.

B) Les interactions directes sont représentées : TERRA-TRF2/1, TERRA-hnRNP-A1; TERRA-hTERT, TERRA-ORC. Les interactions indirectes TERRA : protéines sont aussi représentées: TERRA peut interagir avec ORC ou TRF1/2 afin d'établir une deuxième interaction avec HP1 α .

1.7.4 TERRA et son rôle dans le cancer

L'instabilité télomérique caractérisée par les fusions, les recombinaisons ou cassures au niveau des télomères a toujours été une des conséquences majeures des cancers. La prolifération cellulaire non contrôlée induit l'érosion des télomères et l'apparition de mutations. Différents phénotypes et génotypes peuvent caractériser la cellule cancéreuse, mais 90% des tumeurs dépendent de la réactivation de la télomérase. Cependant, dans 10 % des cancers, les cellules humaines empruntent la voie ALT ou élongation alternative des télomères, qui dépend de la recombinaison aux télomères (Bryan & Reddel, 1997).

Cette voie cellulaire permet aux cellules cancéreuses ou immortalisées de rallonger leurs télomères par un mécanisme indépendant de la télomérase. Ces cellules ALT sont notamment caractérisées par la présence d'ADN extra-chromosomal sous forme circulaire, des corps APB (ALT-associated PML bodies) ou encore des échanges entre télomères de chromatides sœurs ou de télomères bien distincts. De plus, ces cellules ALT sont souvent associées à une hétérogénéité de la taille des télomères (Cesare & Griffith, 2004; Cesare & Reddel, 2010; Yeager et al., 1999). Étant donné que ce type de cellule n'exprime pas la télomérase, la longueur de leurs télomères est maintenue par recombinaison homologue. De plus, l'expression de l'ARN TERRA est élevée dans les cellules ALT comparativement aux cellules télomérase positives. Ainsi, l'importante activité transcriptionnelle de TERRA induit des instabilités télomériques et la recombinaison au sein des cellules ALT. Par ailleurs, TERRA forme des hybrides ARN : ADN dans les cellules de cancer au niveau des télomères (Arora et al., 2014). Il a été montré que ces hybrides formés par TERRA favorise la recombinaison au niveau des télomères au sein des cellules ALT (Yu et al., 2014).

En 2008, Blasco et Schoeftner ont montré que l'expression de TERRA est diminuée de moitié dans les cellules négatives pour la télomérase (*terc*^{-/-}). Ceci suggère que TERRA pourrait interagir avec la télomérase afin de stimuler son expression au sein des cellules cancéreuses télomérase positive. De plus, des oligonucléotides mimant TERRA r(UUAGGG) inhibent, *in vitro*, l'activité de la télomérase issue d'extraits de cellules HeLa ou embryonnaires de souris (Schoeftner & Blasco, 2008). Par ailleurs, une étude a montré que TERRA est surexprimé dans les cellules de cancer comparativement aux cellules primaires, et que cet ARN non codant forme des agrégats, mais que ces derniers ne sont pas, significativement, localisés dans les corps de Cajal et dans les

corps nucléaires PML (Deng, Wang, Xiang, et al., 2012). De plus, cet ARN est surexprimé dans différents types de cancer comme celui du colon, poumon, mais aussi au niveau du cancer gastrique. L'expression de l'ARN TERRA est plus importante au niveau du cancer gastrique comparativement aux autres types de cancer (Deng, Wang, Xiang, et al., 2012).

D'autre part, des études montrent que TERRA interagit avec la télomérase *in vitro* (Redon et al., 2010; Schoeftner & Blasco, 2008). Effectivement, la complémentarité entre la séquence de l'ARN TERRA et la séquence matrice de l'ARN hTR supporte l'idée que TERRA pourrait être un ligand naturel de la télomérase. De plus, des expériences d'essai TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) mesurant l'activité processive de la télomérase, montrent que l'ajout d'oligonucléotides mimant les répétitions télomériques de TERRA inhibe l'enzyme *in vitro* (Redon et al., 2010). Ces études doivent être néanmoins confirmées *in vivo*. En 2013, cette même équipe de recherche a montré que TERRA et la protéine hnRNP-A1 interagissent avec la télomérase afin de jouer un rôle co-régulateur. La protéine hnRNP-A1 est un partenaire de la télomérase et est aussi associée aux répétitions télomériques (LaBranche et al., 1998). Un modèle dans lequel on retrouve trois états cellulaires régulant la télomérase fut proposé : un premier état est décrit par une concentration de la protéine hnRNP-A1 supérieure à celle de TERRA, ce qui permettrait à hnRNP-A1 de lier l'ARN TERRA et les télomères (répétitions télomériques dans les deux cas) ce qui ne permet pas à la télomérase d'exercer son rôle d'allonger les télomères. Un second état dans lequel les concentrations de TERRA et hnRNP-A1 seraient égales pour co-inhiber la télomérase. Enfin, le dernier état correspond à une concentration de hnRNP-A1 inférieure à celle de l'ARN TERRA, ce dernier serait alors en excès et libre de ces interactions avec hnRNP-A1. Dans ce dernier état, on comprend que TERRA disponible interagirait avec la télomérase pour inhiber son activité processive dans les cellules humaines cancéreuses (Redon, Zemp, & Lingner, 2013).

Ces résultats ont permis de poursuivre les expériences de déplétion de TERRA pour étudier son impact sur l'activité de la télomérase. L'équipe de Jeannie Lee a montré que la déplétion de TERRA par l'utilisation d'oligonucléotides antisense (ASO) induit une augmentation de l'activité de la télomérase (Chu et al., 2017). De plus, l'expression de TERRA est très variable selon les types cellulaires, notamment elle est plus importante dans les cellules ALT que dans les cellules télomérase positives (Ng et al. 2009). Bien que les expériences biochimiques apportent de nombreuses informations sur TERRA, il est indéniable de développer les systèmes nécessaires pour

détecter l'expression de TERRA directement dans les cellules, en utilisant la visualisation de cet ARN en cellules vivantes.

1.8 Les différentes techniques d'imagerie de l'ARN en temps réel

L'hybridation in situ à fluorescence a permis d'imager les ARN dans une cellule, mais cette technique nécessite de travailler avec des cellules fixées. Ainsi, des techniques permettant d'accéder à la dynamique des ARN en cellule vivante ont été développées. Le système MS2-GFP est une méthode efficace pour marquer les ARN afin de les détecter par microscopie en temps réel. Cette méthode repose sur l'affinité des tiges boucles MS2, séquences spécifiques insérées au niveau de l'ARN, et de la protéine manteau provenant du phage MS2 (MS2-Coat Protein ou MCP) (Bertrand et al., 1998). La possibilité d'intégrer plusieurs séquences MS2 au sein d'un ARN cible permet une reconnaissance spécifique entre les tiges boucles MS2 et la protéine de manteau MCP, elle-même fusionnée à une protéine fluorescente comme la GFP (Rodriguez, Condeelis, Singer, & DICTENBERG, 2007) (Figure 14).

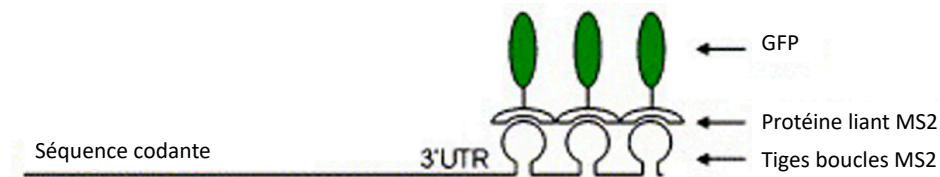


Figure 14 - Le système MS2-GFP (modifié de Rodriguez, Condeelis et al. 2007). Le 3'UTR d'un ARN contient un nombre de tiges boucles MS2 qui sont reconnues par la protéine MS2 fusionnée à la protéine GFP (en vert). Ce système repose sur la reconnaissance des tiges boucles MS2 et de la protéine MS2 coat protein (MCP) fusionnée à la protéine GFP.

En 2013, ce système a permis de détecter l'ARN TERRA chez la levure et de montrer que son expression est augmentée au niveau des télomères courts. De plus, grâce à la visualisation de l'ARN TERRA en temps réel, il a été possible de décrire ses interactions avec les télomères au cours de la phase S du cycle cellulaire (Cusanelli et al., 2013). De plus, un autre système permet de marquer les ARN et de les visualiser en cellule vivante, il s'agit du système PP7-GFP. Ce système est très similaire au système MS2-GFP puisque, comme ce dernier, il repose sur la

reconnaissance spécifique de la protéine de manteau issu du phage PP7 de *Pseudomonas aeruginosa* et d'une séquence en tige-boucle spécifique de l'ARN PP7 insérée au niveau de l'ARN (Lim, Downey, & Peabody, 2001) (Figure 15). La protéine de manteau PP7 est alors fusionnée à une ou deux protéines fluorescentes comme la GFP afin de permettre une amplification de signal lorsqu'on visualise l'ARN par microscopie. Ce système a notamment permis d'étudier l'expression de certains ARN chez la levure ou d'étudier la dynamique de molécule unique d'ARN (Hocine, Raymond, Zenklusen, Chao, & Singer, 2013; Lenstra & Larson, 2016)

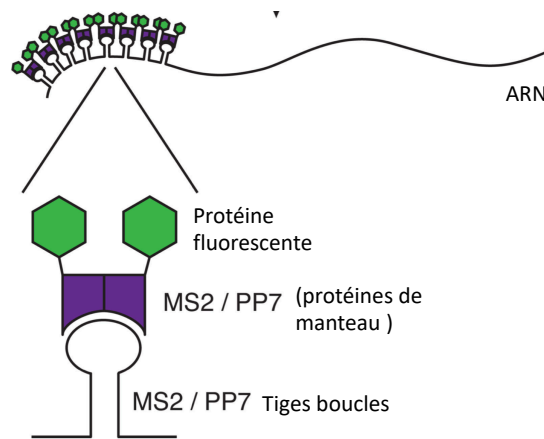


Figure 15 - Schéma représentant les systèmes MS2-PP7-protéine fluorescente (modifié de Lenstra, Larson 2016). Les séquences MS2 et PP7 forment des tiges boucles (stem-loop) au niveau de l'ARN et celles-ci sont reconnues spécifiquement par affinité avec les protéines de manteau MS2 ou PP7 (représentées en violet) fusionnées à une protéine fluorescente (représentée en vert). Ainsi le signal fluorescent permet de visualiser l'ARN cible en cellule vivante.

Une alternative aux systèmes MS2/PP7-GFP est l'utilisation de balises moléculaires qui ont été décrites, pour la première fois en 1996 (Tyagi & Kramer, 1996). Il s'agit de sondes oligonucléotidiques contenant à leur base un fluorophore et un extincteur (quencher) qui forment une structure en épingle à cheveux ne permettant pas à la sonde d'émettre la fluorescence. Lorsque la sonde s'apparie par complémentarité à sa cible, le fluorophore n'est alors plus en contact avec l'extincteur et peut alors émettre des photons et générer un signal (Figure 16).

En 2016, une équipe de recherche a développé un autre système afin de visualiser et d'étudier le niveau d'expression endogène de l'ARN TERRA. Pour ce faire, l'utilisation du domaine Pumilio, qui lie l'ARN de façon séquence-spécifique, a été nécessaire afin de reconnaître TERRA en cellule vivante. En effet, les chercheurs ont construit une sonde fluorescente comprenant deux protéines Pumilio fusionnées à une moitié de la GFP pour régénérer une protéine GFP fonctionnelle. Comme les domaines Pumilio utilisés sont mutés afin de cibler spécifiquement les répétitions télomériques de TERRA, la liaison de ces domaines Pumilio à TERRA permet de générer des protéines GFP fluorescentes sur cet ARN (Yamada et al., 2016). Cette approche a permis de détecter et visualiser la population globale de TERRA dans une cellule.

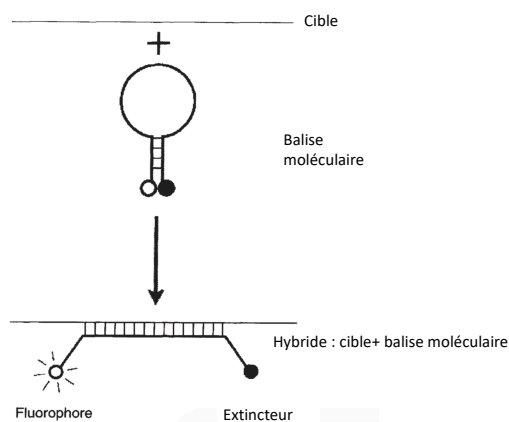


Figure 16 - Représentation du principe des balises moléculaires (modifié de Tyagi, Kramer 1996). Les balises forment une épingle à cheveux ce qui permet au fluorophore et à l'extincteur d'être en contact, dans ce cas il n'y a pas d'émission de fluorescence. Dans le cas, où la sonde réussit à s'apparier avec sa cible, le fluorophore et l'extincteur ne sont plus en contact, l'émission du signal fluorescent est alors possible.

Enfin, d'autres méthodes pour étudier l'ARN en cellule vivante ont été utilisées. En effet, pour étudier spécifiquement la présence des structures G-quadruplexes, structures formées par TERRA en cellule vivante, une équipe de recherche a construit une sonde en utilisant le pyrène. En effet, cette molécule comporte des propriétés fluorescentes et sous sa forme monomère, libre en solution, le pyrène émet un pic d'émission à 400 nm. La formation des structures en G-quadruplexes provoque le rapprochement des molécules de pyrène, permettant ainsi d'émettre un

pic d'émission à 480 nm après photo-excitation. Ce système de sonde a permis de détecter la présence de structure G-quadruplexes en cellules vivantes (Xu, Suzuki, Ito, & Komiyama, 2010).

PROBLÉMATIQUE

Les méthodes d'imagerie décrites ci-dessus pour détecter TERRA en cellules vivantes détectent l'expression de TERRA provenant de tous les télomères et ne permettent pas d'étudier l'expression de TERRA issu d'un télomère unique. À travers ce projet de recherche, nous essayons de comprendre :

1. Comment est exprimé l'ARN TERRA à partir d'un télomère unique? Comment cet ARN TERRA se comporte dans le noyau des cellules au sein des cellules de cancer, notamment en étudiant la localisation et la diffusion de cet ARN.
2. Comment mettre en évidence les partenaires protéiques de TERRA issu d'un seul télomère?

1.9 Objectifs et approches expérimentales proposés

Notre approche repose sur l'utilisation du système d'imagerie MCP-GFP. Les tiges-boucles MS2 fusionnées à notre ARN d'intérêt (TERRA) seront reconnues par la protéine manteau MCP, elle-même fusionnée à une protéine fluorescente (superFolder GFP). Ainsi les complexes TERRA-MS2/MCP-sfGFP seront détectés par microscopie en fluorescence. Un microscope confocal à disque rotatif nous permettra de suivre en temps réel la dynamique de nos particules TERRA à l'échelle de la molécule unique.

Pour étudier l'expression de l'ARN TERRA exprimé à partir d'un seul télomère ainsi que comprendre son rôle en étudiant ses interactions avec des protéines, nous proposons les objectifs suivants :

Objectif 1 – Détection et visualisation de l'ARN TERRA 15q par microscopie en temps réel.

Au cours de ce projet, nous nous intéressons à l'imagerie de l'ARN TERRA à l'échelle de la molécule unique. Nous allons exploiter le système MCP-GFP (MS2 phage Coat Protein) permettant la reconnaissance des tiges-boucles MS2. Des tiges-boucles MS2 ont été intégrées dans la région sous-télomérique du chromosome 15q par le système CRISPR/Cas9 dans des cellules de cancer gastrique AGS. L'introduction d'un vecteur exprimant la protéine de fusion MCP-sfGFP (superfolder Green Fluorescent Protein) nous permet de détecter cet ARN par microscopie en temps réel et d'étudier sa dynamique *in vivo*. Par ailleurs, nous utiliserons la microscopie en temps réel et le marquage des télomères avec un fluorophore mCherry qui nous permettra de visualiser les interactions TERRA : télomères. Dans la suite de l'étude, nous quantifierons l'expression de l'ARN TERRA 15q par PCR quantitative.

Objectif 2 – Développement et mise au point d'une nouvelle technique de co-immunoprécipitation de TERRA.

Dans le but d'identifier les différents partenaires protéiques de l'ARN TERRA 15q, nous allons développer une approche d'immunoprécipitation de l'ARN TERRA-MS2 à l'aide de billes agarose-magnétique greffées d'un anticorps anti-GFP. Nous détecterons la présence de l'ARN TERRA-MS2 15q par RT-PCR et la présence de protéines associées à cet ARN, telles que hnRNP-A1 ou FUS par immunobuvardage.

CHAPITRE 2 - MATERIEL ET METHODES

2.1 Culture cellulaire des cellules AGS

Les cellules AGS proviennent du laboratoire du Dr. Christian Baron à l'Université de Montréal. Elles ont été cultivées dans un milieu de prolifération F12K (Multicell, 312250-CL) qui a été complété avec 2 mM de L-analyl-L-glutamine (glutaMAX, Gibco, 35050-061), 100 IU de pénicilline-streptomycine (Multicell, 450201-EL) ainsi que 15% de sérum de Vœu Fœtal (Gibco, 12483-020) à 37°C, 5% CO₂. Les cellules AGS ont permis de générer de deux clones : AGS #22 et AGS #56 obtenus par l'insertion de 10 séquences MS2 (tige boucles) (voir section 2.2) au niveau du subtélomère et du télomère du chromosome 15 avec le système CRISPR-Cas9 (Dr. Emilio Cusanelli). Le contrôle AGS Wild Type (WT) ne contient pas les séquences MS2. Les cellules AGS sont des cellules diploïdes et ceci permet l'obtention d'au moins une insertion sur deux des séquences tiges boucles MS2 au sein du subtélomère. Les cellules AGS ont été infectées avec un lentivirus UBC-MCP-GFP afin de visualiser les foci d'ARN TERRA 15q. Plusieurs concentrations du lentivirus (1 : 4 ; 1 : 8 ; 1 : 16) ont été testées et une dilution du lentivirus 1 : 16 permet une visualisation du signal fluorescent optimal au microscope. Enfin, les cellules AGS infectées avec le lentivirus ont été triées au FACS afin de garder une population stricte n'exprimant que le lentivirus. Pour visualiser les télomères, les cellules ont aussi été infectées par un lentivirus contenant la protéine TRF1 télomérique fusionnée à la protéine fluorescente mCherry.

2.2 Développement de cellules AGS exprimant l'ARN TERRA 15q endogène avec des tiges-boucles MS2

En collaboration avec le laboratoire du Dr. Emilio Cusanelli (CIBIO, Université de Trento, Italie), les cellules AGS ont été utilisées pour intégrer une cassette contenant 10 tiges-boucles MS2 dans la région sous-télomérique du télomère 15q. Ce télomère a été choisi puisque nous avons pu avoir accès à un fragment entier de ce télomère cloné dans un vecteur BAC, ce qui nous a permis d'y insérer 10 tiges-boucles MS2 et un gène de sélection (Neomycin) flanqué entre des sites loxP (Figure 18). De plus, l'expression de TERRA à partir du télomère 15q a déjà été validée dans plusieurs études (Deng, Wang, Stong, et al., 2012) (Feretzaki & Lingner, 2017). La région sous-télomérique du télomère 15q contient une séquence unique permettant de cibler ce télomère avec

CRISPR-Cas9. Nous avons utilisé des cellules de cancer de l'estomac AGS, car ces cellules sont diploïdes et l'ARN TERRA est connu pour être surexprimé dans cette lignée.

Pour marquer notre ARN d'intérêt au sein des cellules AGS, le système CRISPR-Cas9 a été utilisé pour générer des cassures dans la région sous-télocérique du chromosome 15q et introduire par recombinaison homologue la cassette contenant 10 tiges boucles MS2 et le gène de sélection Neomycin (voir Avogaro et al, 2018 pour les détails). Après sélection de clones et élimination du gène de sélection Neomycin avec la recombinaison Cre, nous avons identifié deux clones : AGS#22 (clone 1) et AGS#56 (clone 2) qui ont intégré les 10 tiges boucles MS2 dans une des deux copies du télomère 15q (Figure 17).

Subtelomere 15q

Clone 1	ATGCAGCATTCCTAATGCACACATGATACGCAAAATATAACACCCACATTGCTCATGTGG
Clone 2	ATGCAGCATTCCTAATGCACACATGATACGCAAAATATAACACCCACATTGCTCATGTGG

	MS2
Clone 1	TAAAGCTTCTTCTCCTAATGCCTTCGATGCAGAAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAC
Clone 2	TAAAGCTTCTTCTCCTAATGCCTTCGATGCAGAAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAC

	MS2
	MS2
Clone 1	GTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAGGATCACCCATGT
Clone 2	GTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAGGATCACCCATGT

	MS2
	MS2
Clone 1	CTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAGGATCAC
Clone 2	CTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAGGATCAC

	MS2
Clone 1	CCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAG
Clone 2	CCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAACATGAG

	MS2
	MS2
Clone 1	GATCACCCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAA
Clone 2	GATCACCCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATGCAGAAA

	MS2
	MS2
Clone 1	CATGAGGATCACCCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATG
Clone 2	CATGAGGATCACCCATGTCTGCACGTCGACTCTAGAAAACATGAGGATCACCCATGTATG

Clone 1	CATTTAGATAATTTTGGAAACATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAATAACTTC
Clone 2	CATTTAGATAATTTTGGAAACATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAATAACTTC

	lox-p site
Clone 1	GTATACAAAATAGCGAG
Clone 2	GTATACAAATAAGCGAAG

Figure 17 - Séquences MS2 au sein du télomère 15. Ici, on remarque les séquences MS2 au sein des deux clones cellulaires (Clone 1 et 2). Le marquage est réalisé par l'intégration des tiges boucles MS2 (séquences surlignées en jaune) dans la région sous-télocérique 15q, site à partir duquel s'est fait l'intégration en utilisant le système CRISPR-Cas9.

Un buvardage de type Southern a été réalisé sur des clones néomycines résistants. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction BamHI et NcoI, puis une sonde radioactive spécifique des tiges boucles MS2 a permis de mettre en évidence une seule bande comme souhaité (à la taille attendue) dans chacun de nos clones cellulaires mettant en évidence une seule insertion au niveau du génome (Figure 18).

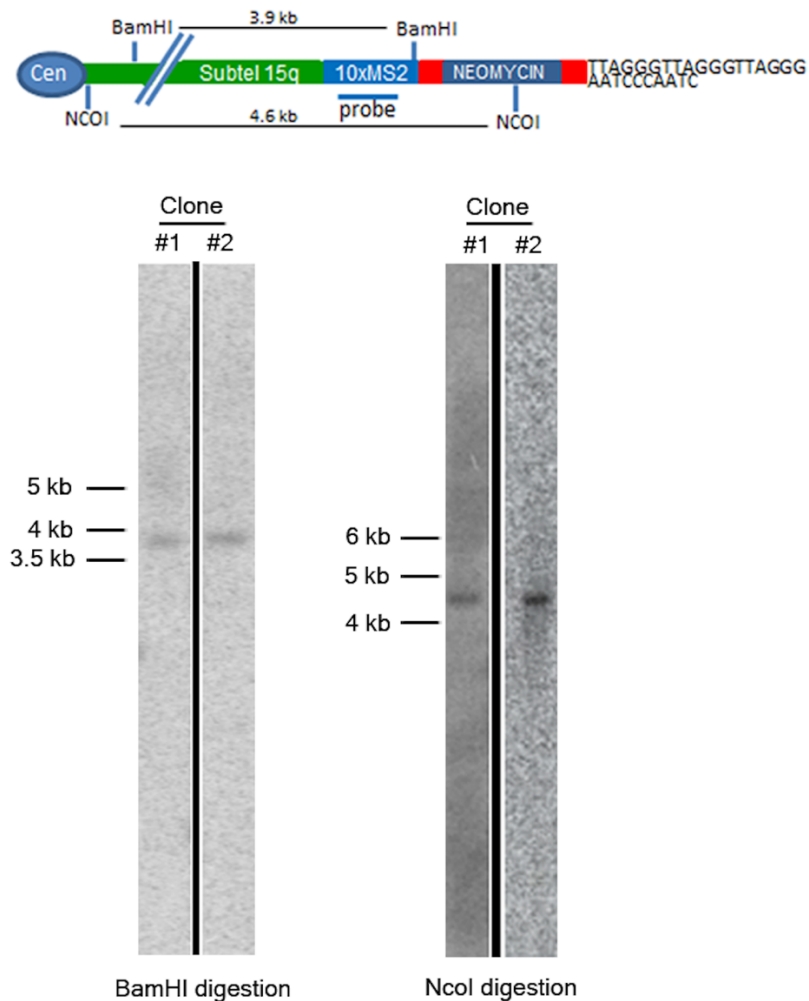


Figure 18 - Description du modèle de marquage de l'ARN TERRA par les tiges boucles MS2 au niveau du chromosome 15 et buvardage de type Southern des clones AGS #22 et AGS#56 (tiré de Avogaro, Querido et al. 2018).

2.3 Microscopie en temps réel

Pour observer les cellules vivantes en temps réel, celles-ci ont été plaquées dans des fluorodish 35mm adaptés au microscope confocal à disque rotatif la veille dans du milieu cellulaire DMEM blanc, (Mutlicell, 319-050 CL) complétement avec 2 mM de L-analyl-L-glutamine (glutaMAX, Gibco, 35050-061), 100 IU de pénicilline-streptomycine (Multicell, 450201-EL) ainsi que 15% de sérum de Veau Foetal (Gibco, 12483-020). Les cellules ont été visualisées à travers l'objectif 63X du microscope avec les conditions similaires (5% CO₂ et une température de 37 °C) afin d'éviter un stress pour les cellules lors de l'acquisition d'images. Pour visualiser l'ARN TERRA issu du chromosome 15, des films en temps réel avec intervalle d'image de 100 ms ont été réalisés. Pour comptabiliser le nombre de foci dans les noyaux des cellules AGS, des images en Z-stack ont été prises avec un temps d'exposition pour la GFP de 100 ms. Pour étudier les colocalisations des ARN TERRA et des télomères, les films avec intervalles de 30 secondes ont été réalisés dans tout le plan de la cellule (Z stack) pour ne manquer aucune colocalisation ARN-télomères. Au total, plus de 100 cellules ont été analysées pour réaliser les statistiques.

2.4 Extraction d'ARN et RT-PCR

2.4.1 Extraction d'ARN total

Tout d'abord, la récolte des cellules s'est faite à partir d'environ 1 million de cellules dans un pétri de 100 mm. Après trypsine (1mL) et ajout de milieu cellulaire F12k, les cellules ont été centrifugées à 2.5 pendant 5 min à 4°C. Le culot a été récupéré, les cellules AGS ont été lavées avec du PBS (Sigma-Aldrich-RNBH4363) deux fois. Après avoir laver les cellules, on a pu extraire l'ARN total avec du TRIZOL (Ambion, 15596026). Après ajout de TRIZOL (1mL), nous avons incubé 10 min à température ambiante nous avons ajouté 200 µl de chloroforme. Nous avons agité à l'aide du vortex et laissé incubé 3 min à température ambiante puis centrifugé pendant 20 min à vitesse maximale, 4°C. Après avoir récupéré le surnageant, nous avons ajouté 500 µl d'isopropanol et agité à l'aide du vortex puis incubé 10 min à température ambiante. Nous avons centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le culot a été repris dans 1ml d'éthanol 70% puis et centrifugé pendant 10 min à vitesse maximale 4°C. La dernière étape consiste à laisser sécher les culots pour les reprendre dans 50 µl H₂O milliQ ou RNase free. La quantification et la détermination de la

pureté de l'ARN isolé ont été déterminées par le spectrophotomètre NanoDrop (ThermoFischer). Les ARN peuvent être conservés à -80°C .

2.4.2 Traitement DNase

1 μg d'ARN a été traité à la DNase I (ThermoScientific, 00353443) dans un volume total de 10 μl contenant le tampon DNase I (10X Reaction Buffer MgCl_2), une incubation à 37°C pendant 30 min a été nécessaire suivi d'un ajout de 1 μl 50 mM EDTA et une incubation à 65°C pendant 10 min. Ce traitement DNase a été réalisé deux fois.

2.4.3 Réaction de réverse transcription - PCR

Une quantité de 250-500 ng d'ARN a été utilisée pour la réaction de reverse transcription à l'aide de l'enzyme SSIV (Super Transcriptase IV) (Invitrogen, 18090010) réalisée avec une première incubation à 55°C pendant 10 min puis une deuxième incubation 80° pendant 10 min. Une séquence spécifique à TERRA ($2\mu\text{M}$) a été utilisée et les amorces utilisées pour la PCR et qPCR sont retrouvés dans l'annexe 1. Le volume de réaction total était de 20 μl . Les échantillons ont été dilués 1 :10 afin de réaliser les réactions de PCR et PCR quantitatif (qPCR). 4 μl du mélange de RT a été utilisé pour la réaction de PCR et q-PCR. La réaction de PCR a nécessité l'utilisation de la Fast Pfu DNA Polymérase (Biobasics). Le programme PCR a été utilisé est décrit dans la section 2.3.4.

2.4.4 PCR quantitatif

L'étude de l'expression de l'ARN TERRA issu du chromosome 15 a été effectuée par PCR quantitatif en utilisant 3 réplicats techniques par échantillon. L'expression de l'ARN a été déterminée par approche SYBR Green en utilisant le kit LUNA (NEB) dans un LightCycler 96 (Roche). Nous avons utilisé 20 ng d'ADNc par réaction de qPCR. Les conditions de q-PCR qui ont été utilisées (45 cycles) : dénaturation initiale à 95°C pendant 60 sec suivi de la dénaturation à 95°C pendant 15 sec, l'élongation à 60°C pendant 30 sec et une élongation finale à 72°C pendant 10 sec. Les résultats de quantifications représentent des C_q moyens de trois réplicats techniques normalisés avec le gène de référence RPLP0. Enfin, l'analyse de quantification la méthode $\Delta\Delta C_t$ a été utilisée selon la formule :

- Expression relative = $E_{\text{cible}}^{\Delta\text{CPcible}(\text{contrôle-échantillon})} / E_{\text{ref}}^{\Delta\text{CPref}(\text{contrôle-échantillon})}$

2.5 Immunoprécipitation de l'ARN

Les cellules ont été récoltées dans du PBS froid (Sigma-Aldrich-RNBH4363). 1 million de cellules ont été utilisées pour l'expérience d'immunoprécipitation. L'expérience a nécessité l'utilisation d'un kit GFP-Trap _MA kit (Chromotek- 810250001MAK) dans lequel on retrouve des billes magnétiques agarose. Pour la lyse des cellules nous avons utilisé le tampon de lyse (10 mM Tris/Cl pH 7.5 ; 150 mM NaCl ; 0.5 mM EDTA ; 0.5% NP40, 0.09% Na-Azide) ainsi que la sonication des cellules (Amplification :1 ; 20 secondes ; 2 cycles). Les lysats cellulaires ont été dilués dans un tampon de dilution (10 mM Tris/Cl pH 7.5 ; 150mM NaCl, 0.5 mM EDTA ; 0.018 % Na-azide). 100 ul des lysats ont été conservés à -20 °C. 20 µl de billes ont été utilisés par échantillons et ont été incubés avec les lysats en agitation pendant 1 h à 4 °C. Enfin, les échantillons ont été soumis à 4 lavages pendant 5 min avec du tampon de dilution puis les lysats ont été élués avec un tampon d'éluion (glycine 200 mM pH 2.5 pendant 30-60 sec avec agitation) suivi d'un ajout de 5 ul d'une solution 1M Tris base pH 10.4). 25µl de l'éluat ont été mélangés avec 25µl de Laemli 2x (Biorad) pour l'utilisation en Western Blot. 25µl de l'éluat ont été utilisés pour l'extraction d'ARN avec TRIZOL.

2.6 Immunobuvardage de type Western

Pour ce faire, nous avons utilisé les gels Mini-PROTEAN TGX stain free gels (Bio-Rad-4568124), nous avons déposé environ 5 % du lysat cellulaire (input) pour les échantillons AGS WT-MCP-GFP, AGS #22 MCP GFP et AGS #22 qui ne contient pas la protéine GFP au sein de son génome. Nous avons déposé environ 30 % de lysat immuno-précipité (IP) afin de révéler la présence de la GFP par immunobavardage et un autre gel a été réalisé pour la détection des protéines partenaires (hnRNP-A1, TRF2, FUS), 70 % de l'échantillon immuno-précipité a été déposé. La migration a été effectuée pendant 1h30 à 100V puis le transfert sur une membrane de nitrocellulose (0.45um ; Bio-Rad -1620115) a été fait à 4°C pendant 1h (90V). La membrane de nitrocellulose est soumise à une coloration PONCEAU afin de vérifier la présence des protéines. Par la suite, nous avons réalisé un blocage de la membrane avec une solution TBST 0.1 % Tween pendant 45 min à température ambiante. Enfin, un anticorps primaire anti GFP (mouse) (dilué 1/1500 TBS 0.1 Tween 5% lait (BioShop- 4J35494) a été déposé avec la membrane à 4°C O/N. Le lendemain, la membrane

a subi 3 lavages pendant 5 min avec la solution de TBST 0.1 % puis l'anticorps secondaire anti-mouse (dilué 1/10000) a été en incubation avec la membrane de nitrocellulose pendant 1 h à température ambiante. La révélation des protéines se fait grâce à l'utilisation du réactif Clarity Western ECL (Bio Rad- 1705061), il s'agit d'un mélange 1 :1 peroxyde et luminol (incubation 5 min) avant de révéler au Chemi-doc (Bio-Rad). Les références des anticorps utilisés sont en annexe 2.

2.7 Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de la moyenne \pm écart type. L'importance statistique a été déterminée avec le test t de Student non apparié en utilisant la logiciel GraphPad Prism (la version 7.04). La valeur $p < 0.05$ a été considérée significative et est représentée sur les figures avec le symbole * (* $p < 0.05$ différence statistique significative, ** $p < 0.01$ très significative, et *** $p < 0.001$ extrêmement significative)

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS

Objectif 1 : Analyse de la dynamique de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS en microscopie en temps réel.

3.1 Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR quantitatif et RT-PCR

Avant d'effectuer l'imagerie de l'ARN TERRA 15q MS2 au microscope, nous avons voulu valider l'expression de cet ARN dans nos cellules. Pour commencer, nous avons effectué une RT-PCR quantitative pour détecter l'ARN TERRA 15q total dans nos deux clones AGS #22 et AGS #56 ainsi que dans les cellules AGS WT (contrôle). Ainsi, nous remarquons que l'ARN TERRA 15q est exprimé de façon similaire dans nos 3 lignées cellulaires (Figure 19).

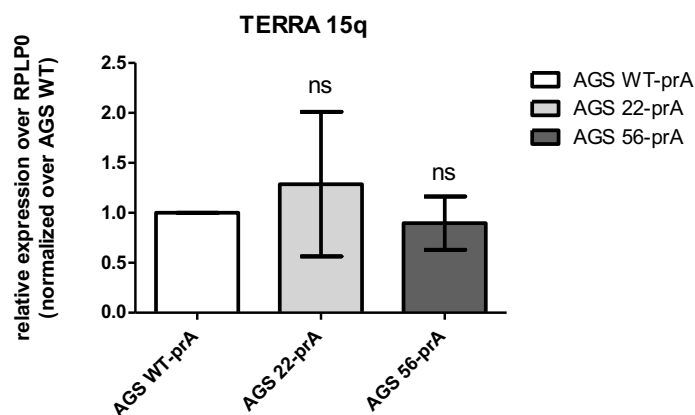


Figure 19 - Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q. Quantification de l'ARN TERRA 15q dans les cellules AGS WT, AGS#22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par RT-PCR quantitatif (N=3). Ns : non-significatif (test de Student). On observe que les trois lignées cellulaires expriment l'ARN TERRA 15q de façon similaire, la différence entre les lignées AGS #22 et #56 est non significative. Nos résultats ont été normalisés avec le contrôle AGS WT.

Ensuite, nous avons quantifié l'expression de TERRA 15q MS2 dans nos lignées cellulaires par RT-PCR quantitatif. Celui-ci est bien exprimé dans nos deux clones AGS #22 et AGS #56.

Bien que TERRA 15q MS2 soit exprimé dans les clones AGS #22 et AGS #56, on observe que TERRA 15q MS2 est exprimé deux fois moins dans le clone AGS #56 comparativement au clone AGS #22. Cependant, selon le test de Student, cette différence est non-significative (Figure 20).

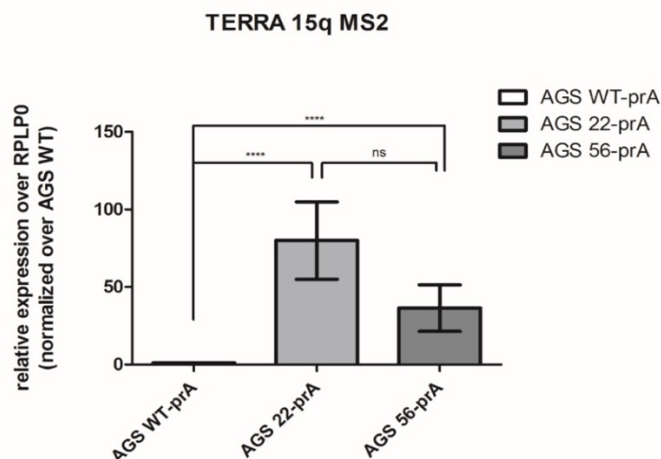


Figure 20 - Quantification de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2. On observe que les deux clones AGS #22 et AGS #56 expriment TERRA 15q MS2 avec une différence non significative. Quantification de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS WT, AGS#22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par RT-PCR quantitatif. Les cellules ont été infectées avec un rétrovirus MSCV-prA au préalable pour des expériences supplémentaires, l'expérience a été répétée 3 fois (N=3) ****p<0.001, Ns : non-significatif (test de Student).

De plus, pour valider l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2, nous avons analysé l'expression de cet ARN dans les clones AGS #22 et AGS #56 par RT-PCR, en utilisant les cellules AGS WT comme contrôle négatif (Figure 21). La taille du fragment attendue est d'environ 500 pb.

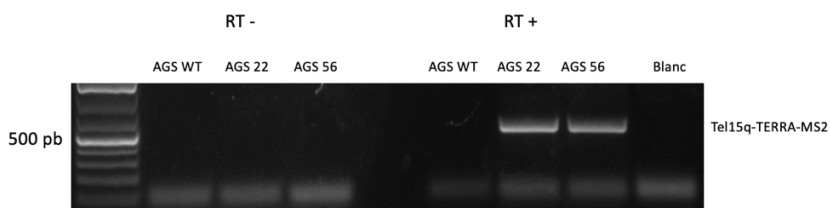


Figure 21 - Analyse de l'expression de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR. Nous avons déposé sur gel d'agarose l'ARN et nous observons deux bandes dans les puits RT+ des cellules

AGS#22 et AGS #56 à la taille correspondante de 500 pb ce qui montre que l'ARN TERRA 15q MS2 a été détecté dans les clones AGS #22 et AGS#56 par RT-PCR. RT- : sans reverse transcriptase; RT+ : avec reverse transcriptase. Blanc : sans ARN.

3.2 Imagerie de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que nos clones cellulaires expriment l'ARN TERRA 15q MS2. Nous avons par la suite utilisé les lignées AGS pour visualiser les molécules d'ARN TERRA issus du télomère 15, préalablement marqué par les 10 tiges boucles MS2 grâce à la microscopie en temps réel. Ces ARN sont visibles sous forme de particules ou foci dans le noyau des cellules AGS#22 et AGS#56. Nous avons confirmé l'absence de tels foci dans notre contrôle négatif AGS WT exprimant la protéine MCP-GFP, suggérant que ces foci sont spécifiques à l'ARN TERRA 15q MS2 (Figure 22).

De plus, nous avons pu observer différentes tailles de ces foci d'ARN TERRA 15q MS2. En effet, il était possible de distinguer des foci d'ARN qui semblaient être de taille et de fluorescence plus élevée que les petits foci décrits comme molécules uniques (voir section 3.4 pour la mise en évidence des molécules uniques) (Figure 22, flèches vertes et blanches respectivement).

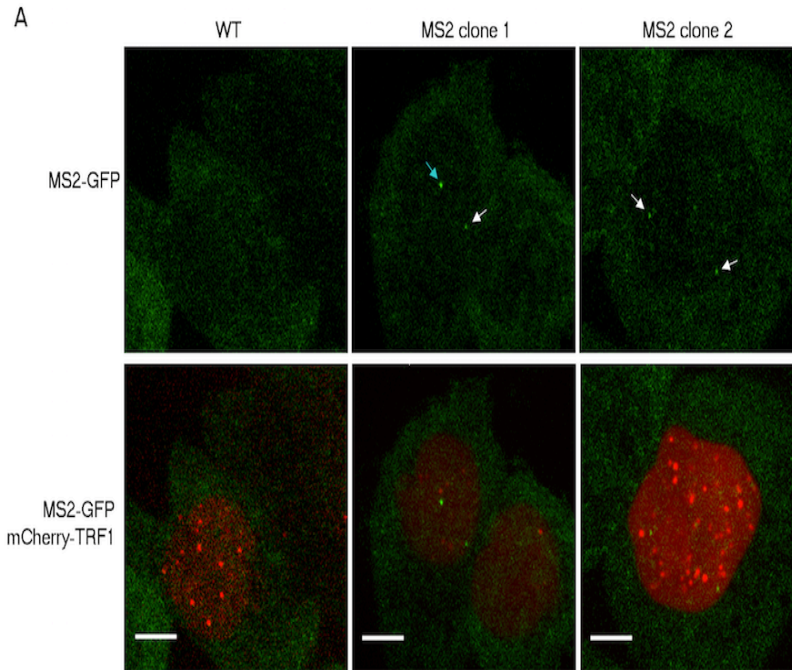


Figure 22 - Imagerie de l'ARN TERRA 15q MS2 et des télomères au sein des clones AGS WT, AGS #22 (clone 1), AGS #56 (clone 2) par microscopie en temps réel en cellule vivante. En première ligne, on observe les clones AGS WT, AGS #22 et AGS #56 comportant le signal MS2 GFP qui permet de marquer l'ARN TERRA 15 q. Les ARN TERRA 15q MS2 sont représentés par les flèches bleu (foci d'ARN) et les flèches blanches selon leur tailles (particules, molécules uniques d'ARN). En deuxième ligne, les images présentent les clones AGS WT, AGS #22 et AGS #56 mais cette fois ci les télomères sont marqués avec mCherry-TRF1 (en rouge) dont le signal permet aussi de délimiter le noyau cellulaire. Échelle : 5 μ m.

3.3 L'ARN TERRA 15q MS2 est présent sous deux formes dans la cellule

Après avoir observé différents foci d'ARN TERRA 15q MS2 dans le noyau des cellules AGS#22 et AGS#56, nous voulions déterminer si ces ARN pouvaient être définis comme des populations distinctes. Pour cela, nous avons mesuré le diamètre de ces différents foci d'ARN et nous avons remarqué deux populations distinctes qui se distinguaient par leur taille, mais aussi par leur dynamique (Figure 23). Le terme "dynamique" fait référence au mouvement ou déplacement

des molécules de TERRA dans le noyau des cellules. Le mouvement des particules peut être plus ou moins rapide et le coefficient de diffusion permet de caractériser ce déplacement.

Ainsi, nous avons pu décrire différentes tailles, qui sont représentées sous forme d'une distribution gaussienne. Il existe une population de foci avec un diamètre moyen de 250 nm et une deuxième population avec un diamètre moyen de 530 nm. Nous avons pris le choix de nommer ces deux populations particules (foci de diamètre moyen de 250 nm) et clusters (foci de diamètre moyen de 530 nm). Les résultats obtenus prennent en compte les deux lignées cellulaires AGS #22 et AGS#56. En effet, dans les deux clones, nous avons observé ces deux populations de TERRA 15q MS2 distinctes qui nous a permis d'établir les diamètres moyens des particules d'ARN. Ces résultats suggèrent que les particules semblent être des molécules uniques d'ARN TERRA 15q MS2 alors que les clusters semblent être une agrégation de plusieurs molécules d'ARN TERRA 15q MS2. Il est important de souligner que c'est la première fois que deux populations de TERRA sont détectées dans les cellules.

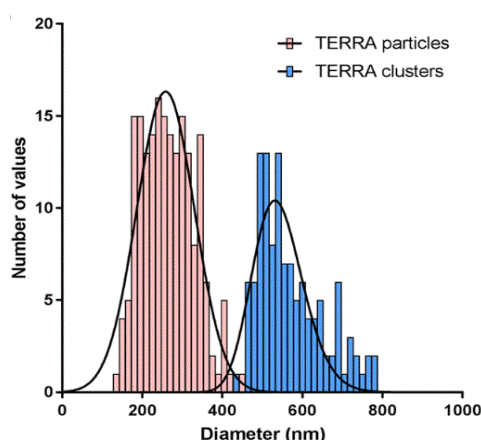


Figure 23 - Distribution Gaussienne des deux populations d'ARN TERRA 15q MS2 distinctes. On observe deux courbes Gaussienne (rose et bleu) qui permet de montrer la distribution des tailles (diamètre) des deux populations d'ARN TERRA 15 q. Celles-ci sont répartis selon leur diamètre, en effet, les molécules uniques (particules, en rose) ont une taille moyenne de 250 nm de diamètre et les clusters (en bleu) ont une taille moyenne de 530 nm de diamètre détectés dans les cellules AGS (AGS #22 et AGS #56).

Après avoir discriminé deux populations différentes telles que les particules et les clusters plus larges, nous nous sommes intéressés à la dynamique de ces deux populations (Figure 24). Après avoir réalisé de nombreux films en temps réel (streaming), nous avons calculé les coefficients de diffusion (Log D) des particules et des clusters d'ARN TERRA 15q MS2 dans les cellules AGS #22 et AGS #56. Nous avons observé que les particules TERRA 15q MS2 sont plus diffusives que les clusters dans le noyau des cellules. En effet, les coefficients de diffusion des particules varient entre 2.1 et $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ avec une valeur moyenne de $0.9 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. Les clusters TERRA 15q MS2 sont plus statiques que les particules puisque leurs coefficients de diffusion varient entre 0.15 et $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{sec}$ avec une valeur moyenne de $0.02 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. Ainsi, les particules d'ARN TERRA 15q MS2 paraissent plus mobiles que les clusters d'ARN ayant un diamètre plus large.

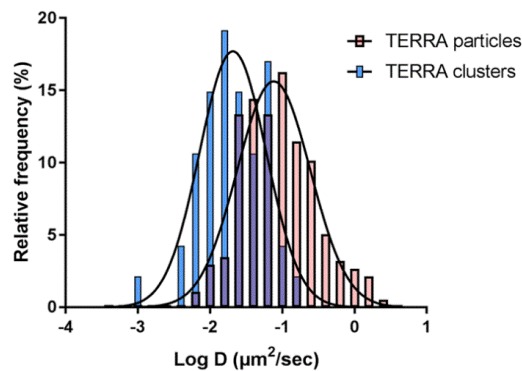


Figure 24 -Distribution gaussienne des coefficients de diffusion des particules et des foci (clusters) d'ARN TERRA 15q MS2. (Voir vidéo en Annexe 3 pour observer les deux types de populations.) On remarque que cette représentation gaussienne présente trois types de dynamiques : une population de particules (en rose) plus dynamique que les clusters (en bleu), une population de clusters moins dynamique que les particules, et une population pour laquelle les coefficients de diffusion des molécules uniques et des clusters se superposent (en violet).

Enfin, ces calculs de coefficients de diffusion ont été réalisés pour les deux clones AGS #22 et AGS#56. On observe que la dynamique des particules et des clusters suit la même distribution dans les clones 1 et 2 (AGS #22 et AGS#56 respectivement) (Figure 25).

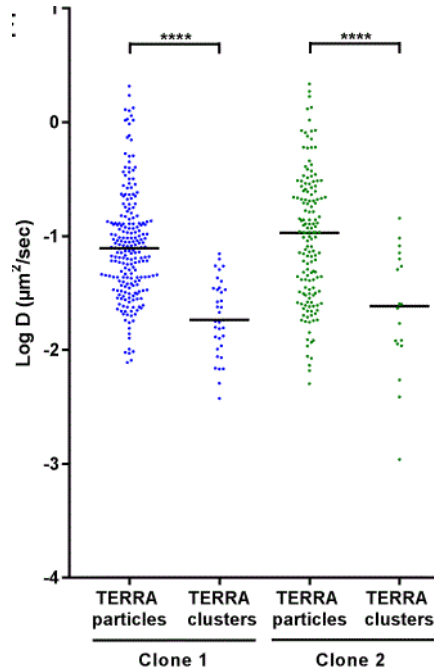


Figure 25 - Coefficients de diffusion (Log D) des particules et clusters d'ARN TERRA 15q MS2. On observe les différences et les similarités des coefficients de diffusions de l'ARN TERRA 15 q dans les deux clones cellulaires (clone 1 en bleu et clone 2 en vert). Chaque point représente une particule ou un cluster de TERRA. On remarque que les particules du clone 1 et du clone 2 suivent la même distribution de coefficient de diffusion et c'est aussi le cas pour les clusters au sein des deux clones cellulaires. L'analyse a été effectuée dans les clones 1 et 2 (AGS #22 et AGS #56 respectivement). **** $p < 0.001$ (test de Student).

3.4 L'ARN TERRA 15q MS2 est fréquemment exprimé dans nos clones cellulaires

Dans le but de comprendre le comportement et la dynamique de cet ARN, nous avons quantifié le nombre de particules et de clusters d'ARN TERRA 15q MS2 présents dans les cellules AGS WT (contrôle), AGS #22 et AGS #56. Nous avons filmé entre 150 et 200 cellules et effectué les acquisitions d'images dans le plan Z des cellules (représentation 3D cellulaire) dans le but de détecter le plus de molécules d'ARN TERRA 15q MS2. Ces images montrent que les molécules

d'ARN TERRA 15q MS2 sont majoritairement présentes dans le noyau des cellules et qu'il est possible d'observer plusieurs particules dans un même noyau (jusqu'à 3), même si la majorité des cellules expriment le plus souvent qu'un seul foci d'ARN. Nous avons quantifié l'expression des ARN TERRA 15q MS2 dans chaque clone et nous avons pu observer que 65% des cellules AGS#22 (Clone 1) semblent exprimer cet ARN alors que seulement 35% des cellules AGS clone #56 (Clone 2) en exprime (Figure 26). Les cellules AGS WT montrent peu de foci dans leur noyau. Ces résultats reflètent nos données de RT-PCR quantitatif, qui ont révélé que l'ARN TERRA 15q MS2 est légèrement plus exprimé dans le clone AGS#22 (clone 1) que dans le clone AGS#56 (clone 2).

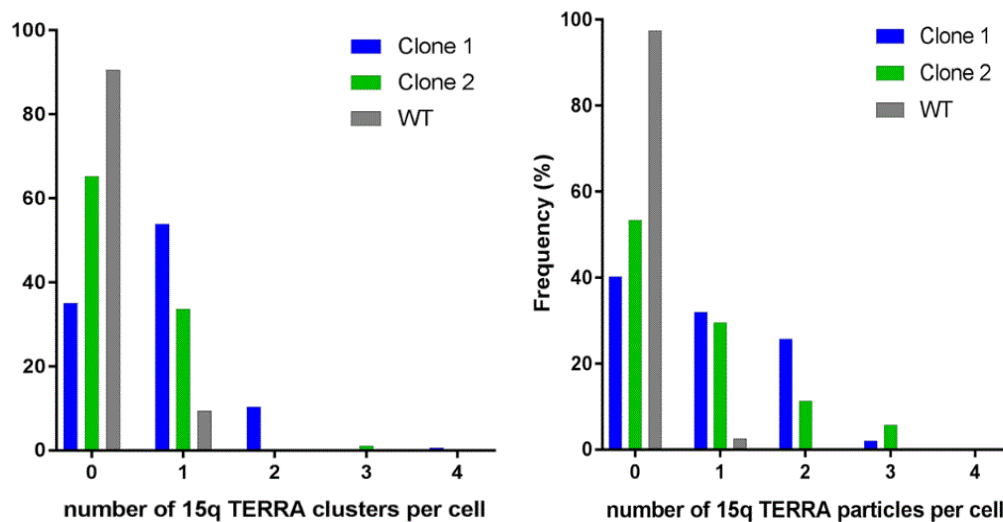


Figure 26 - Expression des ARN TERRA MS2 issu du chromosome 15q (foci et clusters). On remarque que dans le clone 1 (représenté en bleu), il y a 1 cluster ou une particule d'ARN TERRA 15q dans environ 65% des cellules. Dans le clone 2 (représenté en vert), l'ARN TERRA 15q est moins exprimé (environ 35 % des cellules exprime cet ARN). Il est rare d'observer deux cluster TERRA dans une même cellule (10% des cellules des cellules AGS #22, clone 1) alors que les particules de TERRA sont plus fréquentes dans les cellules AGS #22 et AGS #56. Pour la quantification des clusters: N= 95-154 cellules ont été comptées, et pour particules: N= 88-157 cellules ont été comptées, dans les lignées AGS WT, AGS #22 (Clone 1) et AGS #56 (Clone 2).

3.5 Les clusters TERRA 15q MS2 colocalisent avec les télomères

Après avoir étudié la dynamique et quantifié l'expression des ARN TERRA issus du chromosome 15, nous nous sommes intéressés à savoir si ces molécules d'ARN interagissent avec les télomères. Pour ce faire, les télomères ont été marqués avec la protéine télomérique TRF1 fusionnée à la protéine fluorescente rouge mCherry. Nous avons d'abord mesuré les coefficients de diffusion des télomères puis nous les avons comparés avec la dynamique des clusters ou des particules d'ARN TERRA 15q MS2 (Figure 27). Ainsi, nos résultats montrent que le coefficient de diffusion des clusters d'ARN TERRA 15q MS2 possède une distribution similaire à celle du coefficient de diffusion des télomères.

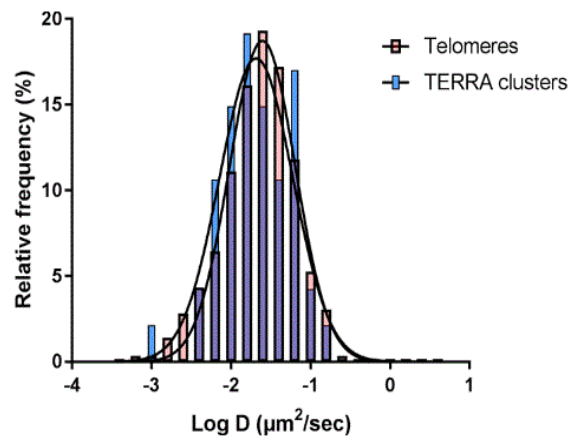


Figure 27 - Distribution des coefficients de diffusion (Log D) des télomères et des clusters d'ARN TERRA 15q MS2. Ici, On observe comment les coefficients de diffusion des télomères (barres orange) et des clusters de TERRA (barres bleues) se répartissent. D'après la distribution Gaussienne, on remarque que les coefficients de diffusion télomères et TERRA se superposent, suggérant que ces deux facteurs ont des coefficients de diffusions comparables.

Pour capturer le plus d'évènements de colocalisation entre l'ARN TERRA 15q MS2 et les télomères, nous avons effectué l'acquisition de plusieurs images en Z-stack. Nous avons étudié les interactions entre les télomères et les clusters d'ARN TERRA 15q MS2, car il est très complexe de détecter les interactions avec les particules de molécules uniques avec ces conditions d'imagerie (voir time-lapse issu de vidéos en Annexe 3). Nous avons détecté des évènements de colocalisations transitoires TERRA-télomères, c'est-à-dire que nous observons des interactions

entre l'ARN TERRA 15q MS2 (clusters) et les télomères qui duraient entre 30 et 60 secondes dans 44 % des cellules (Figure 28).

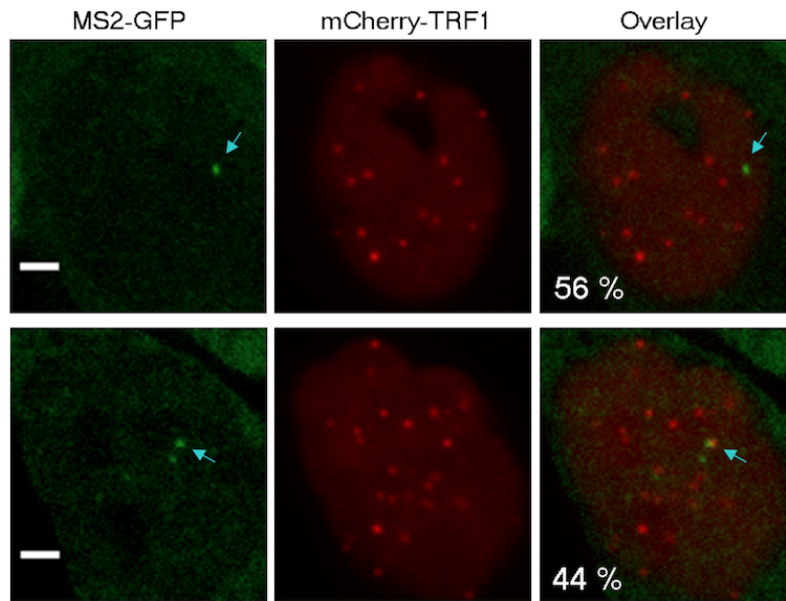


Figure 28 - Imagerie des évènements de colocalisation entre les clusters d'ARN TERRA 15q MS2 et les télomères. Ici, nous observons un des clones cellulaires (AGS#22), la première colonne d'imagerie représente la cellule avec un cluster de TERRA marqué par les tiges boucles MS2-GFP que l'on peut identifier à l'aide d'une flèche bleue. Dans la deuxième colonne d'imagerie, on distingue les télomères marqués par mCherry-TRF1 ainsi que le noyau cellulaire. La dernière colonne représente les interactions observées entre le cluster de TERRA et les télomères. Nous avons observé une interaction TERRA : télomères pour 44 % des cellules. Flèche bleue : Colocalisation entre cluster de TERRA 15q MS2 et les télomères marqués par la protéine TRF1-mCherry (N=55). Voir vidéo en Annexe 3 pour l'observation des interactions. Échelle : 5 μ m.

Objectif 2. Identification des partenaires protéiques de l'ARN TERRA 15q

Le but de cet objectif était d'optimiser un protocole d'immunoprécipitation adapté à l'ARN TERRA 15q MS2 en utilisant les billes nanotrap GFP pour capturer cet ARN associé avec la protéine MCP-GFP. Une fois l'ARN TERRA 15q MS2 immunoprécipité, nous voulons identifier les partenaires protéiques associés avec cet ARN.

3.6 Immunoprécipitation de l'ARN TERRA 15q MS2

Pour cette expérience d'immunoprécipitation, nous avons commencé à suivre, dans un premier temps, un protocole classique n'impliquant aucune étape de sonication bien que notre ARN TERRA ait une localisation nucléaire et soit possiblement associé avec la chromatine. Suite à l'immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP, la présence de la protéine MCP-GFP dans le culot est révélé par immunobavardage. Les résultats obtenus sans sonication des cellules montrent que les lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP expriment bien la protéine MCP-GFP comparativement à la lignée AGS #22 qui n'est pas infectée par le lentivirus-UBC-MCP-GFP (INPUT) (Figure 29). De plus, nous observons une fraction de la protéine MCP-GFP immunoprécipitée (IP) dans les lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP, mais celle-ci reste très faible. En effet, une quantification de la fraction MCP-GFP immunoprécipitée montre que celle-ci correspond entre 4% et 6 % de la population totale dans les cellules AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP, respectivement. Cette faible fraction de protéine MCP-GFP immunoprécipitée ne nous permettra pas d'identifier des éventuels partenaires ni d'amplifier l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR.

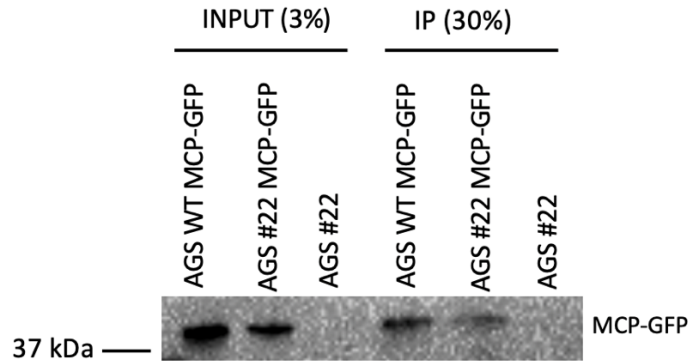


Figure 29 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP sans étape de sonication. La protéine MCP-GFP est détectée par immunobuvardage de type Western dans le lysat total (Input) ou après immunoprécipitation (IP) dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, sans étape préalable de sonication. La protéine MCP-GFP est retrouvée dans les lysats totaux des lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP et ceci est observable pour les échantillons immunoprécipités. On n’observe aucune bande de protéine pour la lignée cellulaire AGS #22 ce qui est cohérent avec cette lignée qui n’expriment pas la protéine MCP-GFP.

Étant donné que la fraction de protéine MCP-GFP immunoprécipitée sans sonication est faible, nous avons poursuivi l’expérience en intégrant une étape de sonication pour augmenter le relâchement des complexes TERRA-protéines associés à la chromatine. Les résultats montrent un signal de la protéine MCP-GFP plus important dans la lignée AGS #22 MCP GFP par rapport au contrôle AGS WT MCP-GFP. Néanmoins, il est à considérer que cette différence de signal de la protéine MCP-GFP dans les différentes lignées peut être liée à une différence de chargement d’échantillon dans les différents puits. Par ailleurs, nous observons que dans les lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP, une fraction de MCP-GFP est immunoprécipitée (Figure 30). Cette fraction immunoprécipitée représente environ 26% de la population de MCP-GFP dans les AGS WT MCP-GFP, contre 18% dans les lignées AGS #22 MCP-GFP. Ainsi, le rendement d’immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP a augmenté avec cette étape de sonication.

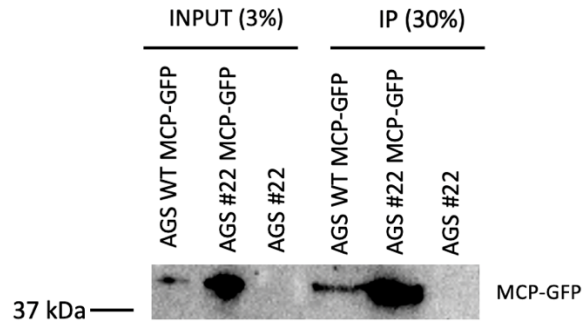


Figure 30 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP avec étape de sonication. La protéine MCP-GFP est détectée par immunobuvardage de type Western dans le lysat total (Input) ou après immunoprécipitation (IP) dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape préalable de sonication. On remarque que l'étape de sonication permet de détecter une portion de protéine MCP-GFP plus importante que sans sonication. On n'observe aucune bande de protéine pour la lignée cellulaire AGS #22 ce qui est cohérent avec cette lignée qui n'expriment pas la protéine MCP-GFP.

Par la suite, pour valider que nous immunoprécipitons TERRA 15q MS2 avec la protéine MCP-GFP, nous avons détecté l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR dans les extraits cellulaires (INPUT) et après immunoprécipitation (IP). Les résultats montrent que TERRA 15q MS2 est exprimé dans la lignée AGS #22 MCP-GFP et on le détecte après immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP (INPUT et IP) (Figure 31). On observe par ailleurs une faible bande dans les lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 (INPUT), alors que l'on devrait détecter cet ARN dans les cellules AGS #22. Il se pourrait que la RT-PCR n'ait pas bien fonctionné dans la fraction totale (INPUT) de la lignée AGS #22. Néanmoins, ces résultats montrent que nous pouvons immunoprécipiter l'ARN TERRA 15q MS2 en utilisant un anticorps qui cible la protéine MCP-GFP qui est associée avec cet ARN.

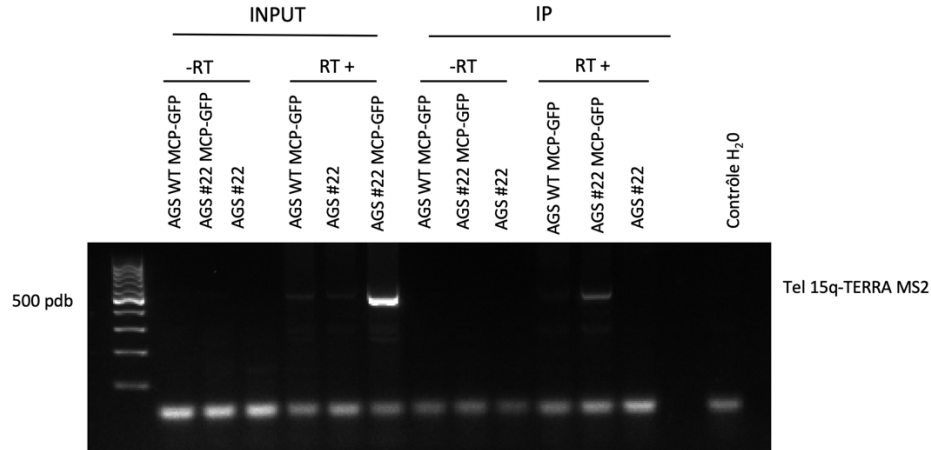


Figure 31 - Détection de l'ARN TERRA 15q MS2 par RT-PCR dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 par RT-PCR. RT- : sans reverse transcriptase; RT+ : avec reverse transcriptase. Blanc : sans ARN. TERRA 15q MS2 a été détecté dans les cellules AGS WT MCP-GFP, clones AGS #22 dans les échantillons INPUT. L'ARN TERRA 15q MS2 a seulement été détecté dans les cellules AGS#22 MCP-GFP pour les échantillons immuno-précipités IP.

3.7 Identification de partenaires protéiques de l'ARN TERRA 15q MS2

Avec ce protocole d'immunoprécipitation de l'ARN TERA 15q MS2, nous avons réalisé un immunobavardage pour identifier les partenaires de cet ARN. Nous avons donc utilisé les fractions immunoprécipitées MCP-GFP (70% du produit d'immunoprécipitation) et nous avons poursuivi avec un immunobavardage sur la protéine hnRNP-A1, une protéine connue pour interagir avec TERRA (Deng, Norseen et al. 2009). L'anticorps anti-hnRNP-A1 utilisé montre hnRNP-A1 à un poids moléculaire de 37 kDa, comme prévu. La bande supérieure correspondant à un variant d'épissage de cette protéine (Figure 32). Comme le montre la figure 32, on remarque que la protéine hnRNP-A1 est détectée dans les fractions immunoprécipitées. Cependant, la protéine hnRNP-A1 est aussi détectée dans le contrôle AGS WT MCP-GFP dans lequel TERRA 15q ne contient pas de tiges boucles MS2. De plus, on obtient un léger signal dans la lignée AGS #22 qui n'exprime pas de protéine MCP-GFP. Donc, il se peut que hnRNP-A1 interagisse de façon non spécifique avec les billes lors de l'immunoprécipitation. De plus, on remarque que dans les lysats cellulaires issus des différentes lignées, la protéine hnRNP-A1 est exprimée à des niveaux différents alors que le

même nombre de cellules a été utilisé pour cette expérience. Cette différence de signal peut alors être due à une différence de chargement des puits. Comme notre but était de détecter la protéine hnRNP-A1 dans un premier temps, nous n'avons pas réalisé de gel avec une protéine contrôle telle que l'actine.

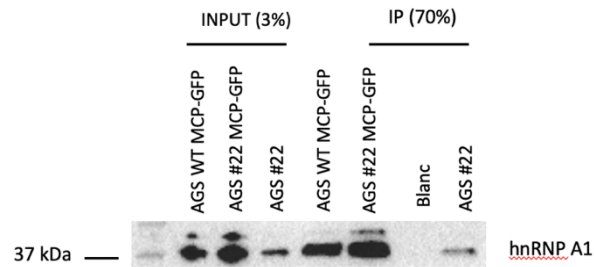


Figure 32 - Co-immunoprécipitation de la protéine hnRNP A1 avec la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22. La protéine hnRNP-A1 est détectée par immunobuvardage de type Western dans le lysat total (Input) ou après immunoprécipitation (IP) de la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication. On remarque deux bandes de protéine dans certaines lignées cellulaires (AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP pour les lysats cellulaires), on observe une faible bande dans l'échantillon immunoprécipité pour la lignée AGS #22.

Par la suite, nous avons tenté de diminuer le bruit de fond dû à la détection de la protéine hnRNP-A1 durant l'immunoprécipitation des extraits issus des lignées AGS WT MCP-GFP et AGS#22. Pour ce faire, nous avons répété l'expérience en bloquant les billes avec 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 2 h à 4 °C, puis nous avons effectué l'expérience d'immunoprécipitation. L'expérience montre d'une part que la protéine MCP-GFP n'est pas exprimée de la même façon dans les lysats cellulaires des lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP. Le contrôle AGS #22 est bien négatif (input). L'expérience montre que l'immunoprécipitation (IP) de la protéine MCP-GFP dans la lignée AGS #22 MCP-GFP a bien fonctionné (Figure 33). Par contre, ce n'est pas le cas pour la lignée AGS WT MCP-GFP, où l'immunoprécipitation ne semble pas avoir fonctionné et qu'on n'observe aucune bande correspondant à la protéine MCP-GFP (Figure 33).

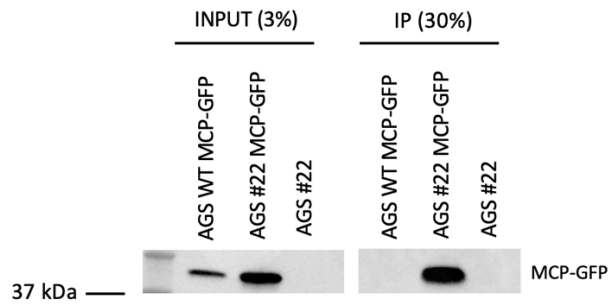


Figure 33 - Immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22. Protéine MCP-GFP détectée par immunobuvardage de type Western dans le lysat total (Input) ou après immunoprécipitation (IP) dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication et blocage des billes à la BSA 2% à 4 °C (2h). On observe une bande de protéine dans les lignées AGS WT MCP-GFP et AGS #22 MCP-GFP des lysats (input). Pour les échantillons immunoprécipités, seule la lignée AGS #22 MCP-GFP montre une bande de protéine MCP-GFP.

Même si dans la lignée AGS WT-MCP-GFP, la protéine MCP-GFP ne semble pas être immunoprécipitée, nous avons poursuivi l'expérience afin de détecter la présence de la protéine hnRNP-A1. En effet, nous voulions savoir si l'interaction non spécifique de hnRNP-A1 serait moins forte suite au traitement avec la BSA. À faible exposition, nous observons un signal équivalent de la protéine hnRNP-A1 dans les trois lysats cellulaires (Input) des lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 (Figure 34). Cependant, à la même exposition, nous n'observons aucun signal de la protéine hnRNP-A1 dans les fractions immunoprécipitées. Cependant, à une exposition plus longue, nous avons réussi à détecter la protéine hnRNP-A1 dans la fraction immunoprécipitée issue de l'extrait de lignée AGS #22 MCP-GFP, alors que cette protéine n'est pas présente dans les fractions immunoprécipitées des lignées AGS WT MCP-GFP et AGS#22.

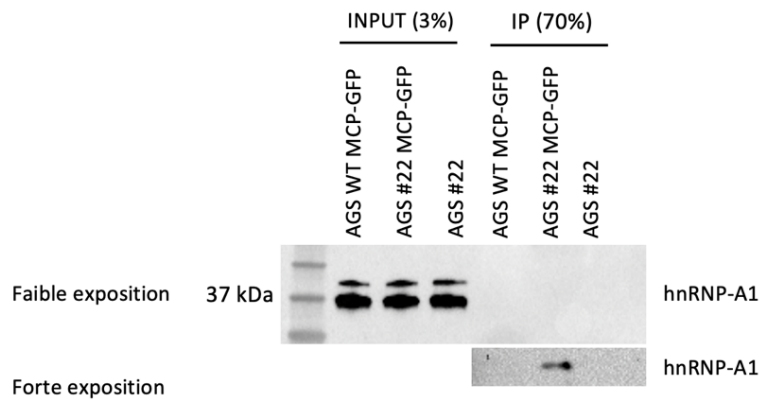


Figure 34 - La protéine hnRNP-A1 interagit avec l'ARN TERRA 15q MS2. Analyse des partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication, suivi d'un immunobavardage de la protéine hnRNP-A1. Avec une faible exposition, on remarque qu'il n'y a aucune bande de protéine hnRNP-A1 pour les échantillons immunoprécipités. Avec une forte exposition, on observe pour la lignée AGS #22 MCP-GFP (IP), une bande correspondante à la protéine hnRNP-A1 alors que celle-ci n'est pas visible pour les autres lignées.

Après avoir détecté la protéine hnRNP-A1 associée avec l'ARN TERRA 15q MS2, nous avons tenté de détecter la protéine télomérique TRF2, qui est aussi connue pour interagir avec TERRA (Deng et al., 2009). Comme pour la protéine hnRNP-A1, nous avons utilisé une exposition faible dans laquelle la protéine TRF2 n'apparaît pas dans la fraction immunoprécipitée des extraits des lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 (Figure 35). Par contre, une exposition plus longue montre la présence de la protéine TRF2 (66 kDa) dans la fraction immunoprécipitée des lignées AGS #22 MCP-GFP et AGS#22 (figure 35). Ce résultat suggère une certaine interaction non spécifique de TRF2 durant l'immunoprécipitation.

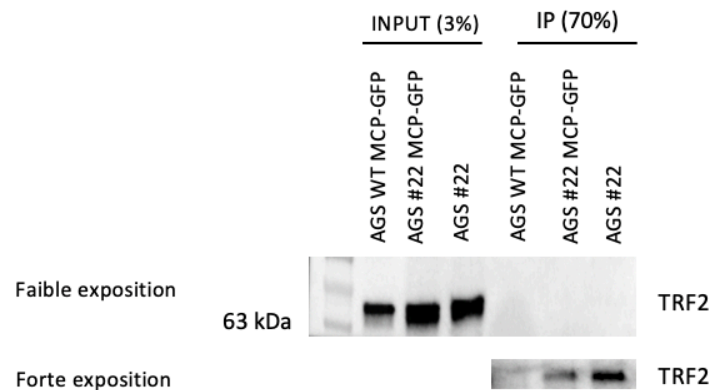


Figure 35 - Interaction de la protéine TRF2 avec l'ARN TERRA 15q MS2. Analyse des partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP, AGS#22, avec étape de sonication, suivi d'un immuno-bavardage de la protéine TRF2 ainsi que blocage des billes avec BSA. Avec une faible exposition, on observe aucune bande de protéine TRF2. On remarque l'apparition de deux bandes de protéines TRF2, à forte exposition, dans les lignées cellulaires AGS WT MCP-GFP.

Nous nous sommes aussi intéressés à la protéine FUS (78 kDa) comme éventuel partenaire de l'ARN TERRA 15q MS2, puisque cette protéine est connue pour interagir avec TERRA (Petti et al., 2019). Cependant, suite à l'immunoprécipitation de la protéine MCP-GFP dans la lignée AGS #22 MCP-GFP, nous ne détectons pas la protéine FUS, même après une exposition plus longue (Figure 36).

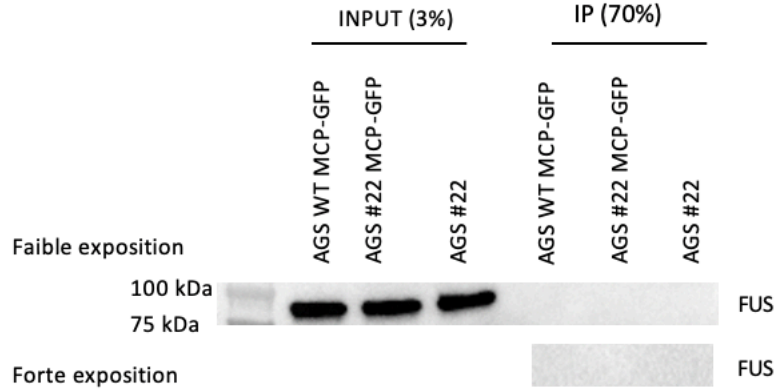


Figure 36 - Interaction de la protéine FUS avec l'ARN TERRA 15q MS2. Analyse des partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication, suivi d'un immuno-bavardage de la protéine FUS ainsi que blocage des billes avec BSA. On n'observe aucune bande dans les échantillons immunoprécipités des lignées cellulaires.

Enfin, nous avons utilisé l'actine comme contrôle de chargement et nous voulions vérifier la spécificité de l'expérience d'immunoprécipitation en utilisant cette protéine qu'on ne devrait pas détecter dans les fractions immunoprécipitées. Pour être en accord avec les précédents résultats, nous avons utilisé les temps d'exposition différents (faible et forte expositions). Nous observons la protéine actine dans les lysats cellulaires des trois lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, mais pas dans les fractions immunoprécipitées (Figure 37).

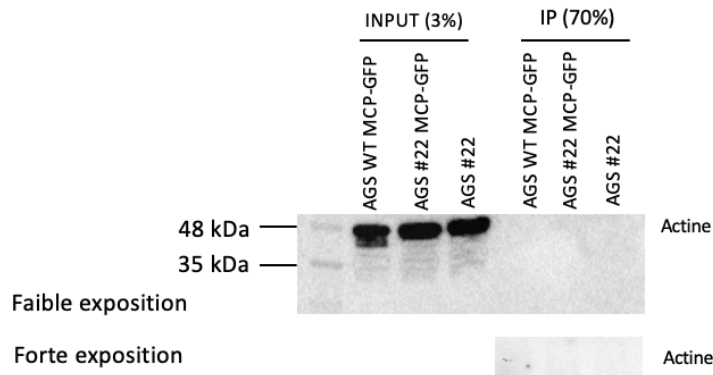


Figure 37 - L'actine n'interagit pas avec l'ARN TERRA 15q MS2. Analyse des partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2 dans les lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, avec étape de sonication, suivi d'un immunobavardage de la protéine actine. Celle-ci est présentée dans les lysats des trois lignées cellulaires. L'actine n'apparaît pas dans les lignées cellulaires immunoprécipitées à faible ou à forte exposition.

Enfin, nous avons effectué une étape de reverse transcription pour l'ARNm RPLP0 afin d'ajouter un contrôle supplémentaire au sein de nos échantillons immunoprécipités. Nous nous attendons à ce que cet ARNm ne soit pas ou peu détecté dans les fractions immunoprécipitées. Cependant, nous remarquons un signal de RT-PCR provenant de l'ARNm RPLP0 au sein des échantillons immunoprécipités (IP) issus des trois lignées cellulaires, ce qui suggère un bruit de fond provenant de cet ARNm durant l'immunoprécipitation (figure 38).

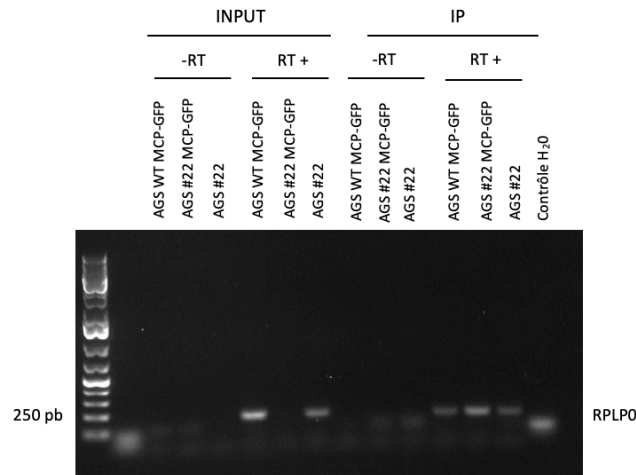


Figure 38 - Détection de l'ARNm RPLP0 par RT-PCR. Suite à l'immunoprécipitation du complexe MCP-GFP/TERRA 15q MS2 à partir d'extraits issus de lignées AGS WT MCP-GFP, AGS #22 MCP-GFP et AGS#22, l'ARNm RPLP0 a été analysé dans les lysats cellulaires (Input) et les fractions immunoprécipitées (IP). -RT : sans reverse transcriptase; RT+ : avec reverse transcriptase. Contrôle H₂O : sans ARN. On observe l'ARNm de RPLP0 dans les lysats cellulaires (Input) avec RT (RT+), uniquement pour les cellules AGS WT MCP-GFP et AGS #22. On observe l'ARNm de RPLP0 dans les 3 lignées cellulaires (RT+). Il est remarquable que d'autres bandes apparaissent ne correspondant pas à l'ARNm de RPLP0.

CHAPITRE 4 – DISCUSSION

4.1 La microscopie en temps réel et l'utilisation du système MCP-GFP permettent d'identifier deux types de population d'ARN TERRA 15q en cellule vivante à l'échelle de la molécule unique

Les nombreuses études sur l'ARN TERRA ont toujours été réalisées sur des populations entières et sur cellules fixées. Notre premier objectif était donc d'étudier l'ARN TERRA en molécule unique et en cellule vivante. En effet, nous voulions apporter des réponses sur le niveau d'expression de cet ARN en cellule vivante et sur sa dynamique en utilisant un système de marquage d'ARN MCP-GFP. Le système MCP-GFP a permis d'observer la localisation et le mouvement de l'ARN TERRA 15q à l'échelle de la molécule unique dans les cellules de cancer gastrique AGS. Bien que la localisation de cet ARN ait été décrite dans la littérature, le comportement cellulaire de l'ARN TERRA reste encore mal connu. Au cours de ce projet de recherche, nous avons observé aussi bien des clusters d'ARN TERRA 15q que des ARN décrits comme particules. Les critères de taille (diamètre) et de coefficients de diffusion ont été importants pour discriminer les populations d'ARN. De plus, l'analyse tridimensionnelle de la cellule a permis de détecter pour la première fois deux populations distinctes d'ARN TERRA 15q. Nous avons montré qu'il semblerait avoir une corrélation entre la taille et le coefficient de diffusion des ARN TERRA 15q. En effet, les particules d'ARN TERRA 15q plus petites sont plus diffusives alors que les clusters, plus imposants restent localisés dans un même endroit au sein du noyau cellulaire. On peut aussi parler de masses différentes puisque les populations de particules sont plus diffusives dans le noyau.

Il est important de soulever que cette étude a permis de détecter ces deux types de populations pour la première fois dans la littérature. En effet, une partie des résultats de ce mémoire ont été publiés dans la revue scientifique *RNA Biology* (Avogaro et al., 2018). Nous avons rencontré des difficultés au cours de ce projet qu'il est important de mentionner afin d'apporter une discussion complète. Tout d'abord, il est nécessaire de mentionner que les clones cellulaires avec l'ARN TERRA 15q marqué avec 10 tiges boucles MS2 ont été générés par le

Dr. Emilio Cusanelli. On peut comprendre la difficulté et la mise au point du protocole suivi pour l'insertion des tiges boucles à l'aide de la technique CRISPR-Cas9 puisqu'il s'agit de cibler un seul télomère dans le génome. Après avoir réussi cette intégration, la visualisation du signal au microscope de l'ARN issu d'un seul télomère a été un défi. Dans un premier temps, les cellules AGS ont été infectées avec un lentivirus exprimant la protéine MCP-GFP afin de visualiser les foci d'ARN TERRA 15q MS2. Cette étape d'infection a nécessité une mise au point. En effet, une concentration de lentivirus trop importante (1:2) permettait de détecter un signal trop important (signal saturé) dans les cellules, et on ne pouvait pas détecter les foci d'ARN au sein des noyaux cellulaires AGS. Il a fallu identifier une concentration pour laquelle le signal fluorescent n'était ni saturé ni trop faible pour étudier le comportement de l'ARN TERRA issu d'un seul locus et déterminer l'expression de celui-ci. Lorsque nous avons déterminé une concentration satisfaisante à la visualisation de notre signal, on a pu observer deux populations distinctes de cet ARN, ce qui était inattendu.

Ce projet de recherche a permis de montrer qu'il était possible de visualiser des populations d'ARN TERRA issus d'un seul télomère en temps réel et en cellules vivantes, ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Le fait que notre projet est en accord avec des résultats rapportés dans la littérature concernant les coefficients de diffusion permet de témoigner de la cohérence à notre étude. En effet, l'équipe de recherche des Dr. Kusumi et Ozawa a aussi observé des ARN TERRA sous forme de foci et sous forme de particules avec des diamètres similaires à nos travaux (200 nm et 500 nm) dans des cellules U2OS par microscopie en cellules vivantes. Nous avons remarqué que nos coefficients de diffusion pour les molécules uniques d'ARN TERRA 15q MS2 et les leurs étaient comparables (en moyenne, $D=0,09\mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour notre étude versus $D=0,15\mu\text{m}^2/\text{sec}$) (Yamada et al., 2016).

Nous pouvons alors utiliser ce système de marquage d'ARN, notamment des ARN non codants, pour tenter de comprendre la dynamique de ces derniers afin d'y émettre des hypothèses sur leurs rôles encore mal connus. Cette méthode d'analyse en temps réel permet aussi de visualiser des interactions ARN-ADN ou ARN-protéine. L'accès à la dynamique moléculaire permet l'identification de nouvelles populations et d'interactions. En effet, nos résultats montrent que TERRA interagit avec les télomères et nous avons détecté ces événements de colocalisation dans 40% des cellules que nous avons analysées et que ces

évènements de colocalisation sont surtout transitoires (60 secondes ou moins). Ceci suggère que TERRA aurait d'autres sites d'interactions, comme des sites extra-téломériques ou d'autres facteurs interactants. Il est important de souligner la difficulté à visualiser les interactions avec les molécules d'ARN TERRA uniques. En effet, nous avons uniquement mis en évidence des interactions entre des clusters de TERRA et les télomères. Les molécules d'ARN ayant une vitesse de mouvement plus rapide étaient plus difficiles à détecter. Ainsi, TERRA aurait d'autres types d'interactions, comme des sites génomiques ou d'autres facteurs interactants.

L'étude menée avec l'équipe du Dr. Cusanelli montre que la déplétion de l'ARN TERRA issu du télomère 15q induit la formation de foci γ H2AX, marqueurs des cassures doubles brin dans l'ADN, au niveau des télomères et majoritairement aux sites extra-téломériques (Avogaro et al., 2018). Ces observations ont été décrites aussi bien lorsque la population totale de TERRA est déplétée ou lorsque l'ARN TERRA issu d'un seul télomère est déplété. Ceci suggère que TERRA aurait un rôle protecteur au niveau des télomères mais également au niveau du génome entier. Comment TERRA pourrait participer à la protection du génome ? Nous avons vu que TERRA interagit avec de nombreux partenaires protéiques permettant cette protection (voir section 1.7.2), ces interactions au niveau des télomères pourraient protéger ces derniers des voies de dommages à l'ADN. En effet, l'apparition des marqueurs de cassures double brin comme les foci γ H2AX montre que les cellules ont activés ces voies de signalisation quand TERRA est déplété.

Les nombreuses études sur l'ARN TERRA ont souvent été décrites à partir de cellules fixées et ne permettaient pas d'apporter d'informations sur la dynamique au sein des cellules humaines. À l'aide de la microscopie en temps réel, il a été possible d'identifier deux populations distinctes de l'ARN TERRA 15q MS2. Plusieurs questions peuvent être soulevées : quel est l'intérêt pour la cellule d'avoir des ARN similaires, mais de dynamique différente ? Est-ce que ces deux populations ont des fonctions différentes ? Est-ce que tous les ARN issus des télomères se comportent de la même façon que l'ARN TERRA 15q MS2 ?

Différentes raisons pourraient expliquer la présence de ces deux populations dans la cellule : en premier lieu, les clusters et les particules pourraient témoigner de fonctions différentes. En effet, on peut émettre l'hypothèse que les clusters, moins diffusifs, seraient

susceptibles d'interagir avec la chromatine formant un complexe ARN-ADN résultant, par exemple, de la formation des boucles R ou alors des hybrides ARN TERRA-ADN télomérique. Ces ARN seraient alors considérés comme une réserve d'ARN fonctionnelle et pourraient intervenir dans des voies métaboliques comme le stress cellulaire. Il est possible que ces clusters d'ARN TERRA puissent lier des complexes de protéines (protéines liant l'ARN). Enfin, ces clusters d'ARN TERRA ont aussi été décrits précédemment chez la levure, ce qui montre une conservation de ce type de population au sein des eucaryotes et que nos résultats sont consistants avec la littérature (Cusanelli et al., 2013).

Les particules d'ARN, plus mobiles pourraient représenter une population libre dans le noyau, interagissant avec des protéines nucléaires, afin d'y jouer un rôle régulateur de l'expression génique, comme avec l'hélicase ATRX. Effectivement, le groupe de recherche de Jeannie T. Lee a mis en évidence des interactions protéines : TERRA avec TRF2 et ATRX (Chu et al., 2017). Nous avons donc réussi à marquer et détecter notre ARN d'intérêt avec le système MCP-GFP et l'utilisation de la microscopie en temps réel. Ce système peut être alors exploiter pour l'étude d'autres ARN en cellules vivantes.

4.2 Développement d'un nouveau protocole d'immunoprécipitation de l'ARN TERRA 15qMS2 pour la détection de ses partenaires protéiques.

Bien que les études menées sur le protéome de l'ARN TERRA soient nombreuses, celles-ci ont toujours été réalisées à partir de population d'ARN TERRA entière. Ici, nous avons cherché à identifier des partenaires à l'ARN TERRA 15q. Il est important de souligner que les études de co-immunoprécipitation actuelles sont réalisées d'abord à partir de l'isolation d'une protéine en particulier, comme TRF1, TRF2 ou hnRNP-A1, suivi de la détection de l'ARN TERRA en ciblant les répétitions télomériques communes à toutes les molécules de TERRA. Dans notre projet, le défi fut d'immunoprécipiter les molécules de TERRA issues d'un seul télomère, celui du chromosome 15q. Pour cela, il a fallu mettre en place un nouveau protocole, qui a nécessité une importante mise au point. Nous allons diriger la discussion de ce protocole

en développant les points importants pour mener à bien l'immunoprécipitation et apporter d'éventuelles solutions aux problèmes rencontrés au cours de ces expériences.

Nous avons cherché à mettre au point un protocole d'immunoprécipitation de l'ARN TERRA 15q MS2 en utilisant la protéine MCP-GFP comme hameçon pour co-immunoprécipiter cet ARN. Puis, nous avons effectué plusieurs immunobuvardage afin de déterminer si des protéines connues pour interagir avec la population de TERRA totale étaient retrouvées parmi les culots afin de valider nos résultats. Nos résultats montrent que la protéine MCP-GFP et l'ARN TERRA 15q MS2 peuvent être immunoprécipités avec notre protocole.

Au travers de cette expérience d'immunoprécipitation, nous ne voulions pas effectuer de sonication puisque nous cherchions à détecter des interactions protéines : ARN. En effet, ces dernières pouvaient être affectées par l'étape de sonication. Cependant, lorsque nous avons vérifié par immunobavardage la présence de la protéine MCP-GFP après l'immunoprécipitation, nous avons remarqué que l'immunoprécipitation de cette protéine n'était pas efficace. Effectivement, suite à la quantification des fractions immunoprécipitées, la quantité de protéine MCP-GFP représentait un pourcentage d'environ 4-6 % de l'échantillon total. Ainsi, nous avons procédé par une expérience intégrant une étape de sonication et nous pouvons observer par immunobavardage que la fraction immunoprécipitée semble plus importante. En effet, lorsque nous réalisons la quantification de la protéine MCP-GFP, nous obtenions un pourcentage d'immunoprécipitation d'environ 20-25%, c'est-à-dire jusqu'à 6 fois plus qu'en absence de sonication. Nous avons donc conclu que la sonication était une étape importante pour que l'immunoprécipitation soit efficace, suggérant qu'une partie de cette protéine peut être associée à la chromatine via l'ARN TERRA 15q MS2. Effectivement, nous avons montré que l'ARN TERRA 15q MS2 co-immunoprécipite avec la protéine MCP-GFP. Nous nous sommes demandé si cette fraction immunoprécipitée était suffisante pour détecter les partenaires protéiques.

Pour détecter les partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2, nous devons vérifier si la sonication n'induisait pas la perte des interactions protéine-ARN ou encore la dégradation de l'ARN d'intérêt. Après avoir détecté la présence de la protéine MCP-GFP, nous nous sommes intéressés aux protéines partenaires de l'ARN TERRA 15q MS2.

Dans un premier temps, nous avons essayé à plusieurs reprises de détecter la protéine hn-RNPA1 connue pour être un des partenaires protéiques de l'ARN TERRA (Deng et al., 2009) (Yamada et al., 2016). D'après les résultats obtenus, nous avons réussi à confirmer que cette protéine est bel et bien un partenaire de l'ARN TERRA 15q MS2. La présence de la protéine hn-RNPA1 observé dans les lignées AGS WT-MCP-GFP et AGS #22 après immunoprécipitation pourrait représenter un bruit de fond, c'est-à-dire à des interactions non spécifiques. Même si cette population de cellule a été triée au FACS, il se pourrait qu'au cours du temps, la protéine MCP-GFP s'exprime plus faiblement dans la lignée cellulaire AGS WT.

Cette expérience de co-immunoprécipitation nécessite encore une mise au point et nous avons constaté que d'autres protéines pouvaient être détectées, comme la protéine télomérique TFR2, connue pour interagir avec TERRA. Cependant la spécificité de nos résultats concernant les partenaires doit être élaborée à nouveau. En effet, pour la protéine FUS, aucun signal de la protéine n'a été obtenu par immunobuvardage après immunoprécipitation, ce qui laisse penser qu'il n'y a pas d'interaction FUS-TERRA 15q MS2 ou que cette interaction est faible. Néanmoins, notre contrôle protéique (Actine) ne montre pas d'interaction dans les échantillons immunoprécipités pour MCP-GFP et ceci même à plus longue exposition, ce qui valide la spécificité de notre essai pour l'ARN TERRA 15q MS2.

Nous pouvons penser que la lignée AGS WT MCP-GFP exprime une plus faible quantité de protéine MCP-GFP et ceci peut donc être une limite pour l'expérience d'immunoprécipitation avec cette lignée. En effet, si la quantité de départ de cette protéine est faible (input), il semblerait alors difficile de la détecter dans l'échantillon AGS WT MCP-GFP après immunoprécipitation (IP). Il est difficile de savoir si l'expérience d'immunoprécipitation n'a pas fonctionné pour cette lignée cellulaire ou si celle-ci ne permet pas d'immunoprécipiter une quantité suffisante de protéine MCP-GFP afin de la détecter par immunobuvardage avec seulement 30% de l'échantillon déposé. En effet, il faudrait alors déposer une quantité d'échantillon immunoprécipité (IP) plus importante. Néanmoins, nos résultats supportent les données précédentes que hnRNP-A1 est un partenaire de l'ARN TERRA 15q.

Au cours des expériences de mise au point des essais de co-immunoprécipitation, nous pouvons comprendre qu'il semble complexe de pouvoir identifier plusieurs partenaires protéiques ou d'isoler l'ARN TERRA 15q MS2 sans obtenir de bruit de fond important. Ceci mène à penser qu'une étape de traitement à la DNase supplémentaire serait à considérer. Par

ailleurs, à plusieurs reprises, la détection de notre ARN par RT-PCR était négative, ce qui montre que cette expérience nécessite d'être encore mis au point. L'étape de sonication pourrait dégrader une partie de notre population d'ARN d'intérêt. Cependant, il semblerait que notre ARN ne semble pas être affecté étant donné que l'on récupère un produit issu de l'expérience de RT-PCR a pour les amorces pour l'ARNm RPLP0.

Enfin, il faut prendre en compte le fait que très peu d'ARN TERRA 15q est récupéré puisqu'il s'agit d'un ARN issu d'un seul télomère et que nos données d'imagerie montrent que cet ARN n'est pas très fortement exprimé. En effet, les études sur l'ARN TERRA sont souvent réalisées sur la population entière. L'étape d'extraction au TRIZOL est cruciale, car nous pouvons perdre une grande partie de notre ARN immunoprécipité étant donné sa faible abondance, il est extrêmement difficile d'observer un culot d'ARN lors des différentes étapes de l'extraction. Nous avons aussi effectué des extractions et purifications d'ARN à l'aide de colonnes RNeasy (Qiagen), mais ceci n'a pas abouti à de résultats convaincants. En effet, il est connu que l'ARN TERRA possède une taille hétérogène et tous les ARN ayant une taille inférieure à 250 nucléotides ne peuvent être récupérés avec ces colonnes. Ceci est une raison pour laquelle nous avons préféré l'extraction de l'ARN au TRIZOL.

La détection des signaux des ARN dans les lysats cellulaires pourrait correspondre à un bruit de fond et pourrait être amélioré en utilisant un nombre de cycles de PCR moins important. Par ailleurs, il serait à considérer d'ajouter une étape de fixation (cross-linking) permettant de fixer les interactions TERRA : protéine et de récupérer une quantité de protéine associée à cet ARN qui soit suffisante pour être détectée par immunobuvardage. Ceci nous permettrait alors d'effectuer une quantification puisqu'au cours de ce travail, nous n'avons pu reproduire assez de résultats dus aux difficultés d'isoler l'ARN TERRA 15q MS2 ou d'obtenir un signal équivalent de protéine MCP-GFP au sein des lignées AGS WT et AGS #22 par immunobavardage. Cependant l'étape de fixation pourrait aussi nuire à la détection de l'ARN TERRA 15q MS2 étant donné qu'il faut ajouter une étape dans laquelle cette fixation doit être éliminée pour réaliser l'étape de RT-PCR. Finalement, le bruit de fond observé dans l'expérience d'immunobavardage pour la protéine TRF2 nécessite peut-être l'utilisation d'un autre anticorps ou des approches de blocage des billes plus efficace.

CONCLUSION

Avec ce projet de recherche, nous avons mis en évidence pour la première fois deux types de population d'ARN TERRA 15q grâce à la microscopie en temps réel et à l'utilisation du système MCP-GFP. Nous avons montré que cet ARN peut se trouver au sein du noyau sous la forme de cluster de plusieurs molécules localisées ou bien sous forme de molécule unique. La microscopie en temps réel a permis d'étudier les interactions ARN-télomères et pourrait être exploitée pour déterminer d'autres interactions ARN : protéines ou entre un ARN et un locus du chromosome humain.

Par ailleurs, nous avons développé un protocole afin d'immunoprécipiter l'ARN TERRA 15q marqué de tiges-boucles MS2 à l'aide de billes magnétique-agarose sur lesquelles des anticorps anti-GFP ont été greffés. Ainsi, nous avons tenté de détecter par immunobavardage les partenaires protéiques. Cette technique nécessite encore de la mise au point, mais pourrait être intéressante pour détecter de nouvelles interactions ARN : protéines en combinant cette approche d'immunoprécipitation avec la spectrométrie de masse. En effet, au cours de notre recherche, nous avons pu mettre en évidence des interactions impliquant un ARN issu d'un seul télomère alors que toutes les études sont réalisées sur des populations entières d'ARN TERRA produit par tous les télomères. Cette technique pourrait nous permettre d'identifier alors différentes interactions en fonction du télomère duquel l'ARN est transcrit. Comme TERRA est surexprimé dans les cellules de cancer de l'estomac, il serait alors intéressant d'étudier les interactions ARN : biomarqueurs dans ce type de cancer ou de mettre en évidence des interactions ARN : facteurs oncologiques.

Références bibliographiques

- Arnoult, N., Van Beneden, A., & Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(9), 948-956.
- Arora, R., Lee, Y., Wischnewski, H., Brun, C. M., Schwarz, T., & Azzalin, C. M. (2014). RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nat Commun*, *5*, 5220.
- Avogaro, L., Querido, E., Dalachi, M., Jantsch, M. F., Chartrand, P., & Cusanelli, E. (2018). Live-cell imaging reveals the dynamics and function of single-telomere TERRA molecules in cancer cells. *RNA Biol*, *15*(6), 787-796.
- Azzalin, C. M., & Lingner, J. (2008). Telomeres: the silence is broken. *Cell Cycle*, *7*(9), 1161-1165.
- Azzalin, C. M., & Lingner, J. (2015). Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends Cell Biol*, *25*(1), 29-36.
- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriantuli, L., Giulotto, E., & Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, *318*(5851), 798-801.
- Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science*, *292*(5524), 2075-2077.
- Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., & Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, *8*(3), 177-180.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H., & Long, R. M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell*, *2*(4), 437-445.
- Brieno-Enriquez, M. A., Moak, S. L., Abud-Flores, A., & Cohen, P. E. (2019). Characterization of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) localization and protein interactions in primordial germ cells of the mousedagger. *Biol Reprod*, *100*(4), 950-962.
- Bryan, T. M., & Reddel, R. R. (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer*, *33*(5), 767-773.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*, *34*(19), 5402-5415.
- Cesare, A. J., & Griffith, J. D. (2004). Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*, *24*(22), 9948-9957.
- Cesare, A. J., & Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*, *11*(5), 319-330.
- Chu, H. P., Cifuentes-Rojas, C., Kesner, B., Aeby, E., Lee, H. G., Wei, C., et al. (2017). TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. *Cell*, *170*(1), 86-101 e116.
- Cusanelli, E., Romero, C. A., & Chartrand, P. (2013). Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell*, *51*(6), 780-791.
- Dai, J., Punchihewa, C., Ambrus, A., Chen, D., Jones, R. A., & Yang, D. (2007). Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res*, *35*(7), 2440-2450.

- De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J. F., et al. (2008). Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie*, *90*(1), 131-155.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, *19*(18), 2100-2110.
- Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., & Lieberman, P. M. (2009). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell*, *35*(4), 403-413.
- Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H. S., et al. (2012). A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J*, *31*(21), 4165-4178.
- Deng, Z., Wang, Z., Xiang, C., Molczan, A., Baubet, V., Conejo-Garcia, J., et al. (2012). Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci*, *125*(Pt 18), 4383-4394.
- Doksani, Y., Wu, J. Y., de Lange, T., & Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell*, *155*(2), 345-356.
- Feretzi, M., & Lingner, J. (2017). A practical qPCR approach to detect TERRA, the elusive telomeric repeat-containing RNA. *Methods*, *114*, 39-45.
- Feretzi, M., Renck Nunes, P., & Lingner, J. (2019a). Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. *RNA*.
- Feretzi, M., Renck Nunes, P., & Lingner, J. (2019b). Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. *RNA*, *25*(11), 1470-1480.
- Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., & Lingner, J. (2010). TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett*, *584*(17), 3812-3818.
- Flores, I., & Blasco, M. A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*, *584*(17), 3826-3830.
- Giraud-Panis, M. J., Pisano, S., Benarroch-Popivker, D., Pei, B., Le Du, M. H., & Gilson, E. (2013). One identity or more for telomeres? *Front Oncol*, *3*, 48.
- Graf, M., Bonetti, D., Lockhart, A., Serhal, K., Kellner, V., Maicher, A., et al. (2017). Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell*, *170*(1), 72-85 e14.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, *43*(2 Pt 1), 405-413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., et al. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, *97*(4), 503-514.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, *27*(9-10), 922-935.
- Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., & Bailey, C. (1992). Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry*, *31*(3), 833-841.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, *37*, 614-636.
- Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J. A., & Singer, R. H. (2013). Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nat Methods*, *10*(2), 119-121.
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M. R., Wellinger, R. J., & Chabot, B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet*, *19*(2), 199-202.

- Laguerre, A., Hukezalie, K., Winckler, P., Katranji, F., Chanteloup, G., Pirrotta, M., et al. (2015). Visualization of RNA-Quadruplexes in Live Cells. *J Am Chem Soc*, *137*(26), 8521-8525.
- Laguerre, A., Wong, J. M., & Monchaud, D. (2016). Direct visualization of both DNA and RNA quadruplexes in human cells via an uncommon spectroscopic method. *Sci Rep*, *6*, 32141.
- Legassie, J. D., & Jarstfer, M. B. (2006). The unmasking of telomerase. *Structure*, *14*(11), 1603-1609.
- Lenstra, T. L., & Larson, D. R. (2016). Single-Molecule mRNA Detection in Live Yeast. *Curr Protoc Mol Biol*, *113*, 14.24.11-14.24.15.
- Lim, F., Downey, T. P., & Peabody, D. S. (2001). Translational repression and specific RNA binding by the coat protein of the Pseudomonas phage PP7. *J Biol Chem*, *276*(25), 22507-22513.
- Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., & Cech, T. R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, *276*(5312), 561-567.
- Liu, B., Maekawa, T., Yoshida, K., Ly, N. H., Inoue, K., Hasegawa, A., et al. (2019). Telomere shortening by transgenerational transmission of TNF-alpha-induced TERRA via ATF7. *Nucleic Acids Res*, *47*(1), 283-298.
- Lopez de Silanes, I., Grana, O., De Bonis, M. L., Dominguez, O., Pisano, D. G., & Blasco, M. A. (2014). Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. *Nat Commun*, *5*, 4723.
- Luke, B., & Lingner, J. (2009). TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *EMBO J*, *28*(17), 2503-2510.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., & Lingner, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, *32*(4), 465-477.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., & Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, *88*(5), 657-666.
- Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, *114*(2), 241-253.
- Mazzolini, R., Gonzalez, N., Garcia-Garijo, A., Millanes-Romero, A., Peiro, S., Smith, S., et al. (2017). Snail1 transcription factor controls telomere transcription and integrity. *Nucleic Acids Res*.
- Mitchell, J. R., Cheng, J., & Collins, K. (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol*, *19*(1), 567-576.
- Montero, J. J., Lopez de Silanes, I., Grana, O., & Blasco, M. A. (2016). Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. *Nat Commun*, *7*, 12534.
- Moye, A. L., Porter, K. C., Cohen, S. B., Phan, T., Zyner, K. G., Sasaki, N., et al. (2015). Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nat Commun*, *6*, 7643.
- Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J*, *277*(5), 1118-1125.
- Neidle, S., & Parkinson, G. N. (2003). The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol*, *13*(3), 275-283.
- Oliva-Rico, D., & Herrera, L. A. (2017). Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mech Ageing Dev*, *167*, 16-23.

- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-334.
- Petti, E., Buemi, V., Zappone, A., Schillaci, O., Broccia, P. V., Dinami, R., et al. (2019). SFPQ and NONO suppress RNA:DNA-hybrid-related telomere instability. *Nat Commun*, 10(1), 1001.
- Pfeiffer, V., Crittin, J., Grolimund, L., & Lingner, J. (2013). The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening. *EMBO J*, 32(21), 2861-2871.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., & Lingner, J. (2014). Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat Commun*, 5, 5379.
- Porro, A., Feuerhahn, S., & Lingner, J. (2014). TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. *Cell Rep*, 6(4), 765-776.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P., & Lingner, J. (2010). Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol*, 30(20), 4808-4817.
- Redon, S., Reichenbach, P., & Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res*, 38(17), 5797-5806.
- Redon, S., Zemp, I., & Lingner, J. (2013). A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. *Nucleic Acids Res*, 41(19), 9117-9128.
- Rodriguez, A. J., Condeelis, J., Singer, R. H., & Dichtenberg, J. B. (2007). Imaging mRNA movement from transcription sites to translation sites. *Semin Cell Dev Biol*, 18(2), 202-208.
- Roth, A., Harley, C. B., & Baerlocher, G. M. (2010). Imetelstat (GRN163L)--telomerase-based cancer therapy. *Recent Results Cancer Res*, 184, 221-234.
- Sagie, S., Ellran, E., Katzir, H., Shaked, R., Yehezkel, S., Laevsky, I., et al. (2014). Induced pluripotent stem cells as a model for telomeric abnormalities in ICF type I syndrome. *Hum Mol Genet*, 23(14), 3629-3640.
- Sagie, S., Toubiana, S., Hartono, S. R., Katzir, H., Tzur-Gilat, A., Havazelet, S., et al. (2017). Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids. *Nat Commun*, 8, 14015.
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., & Pluckthun, A. (2001). In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8572-8577.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., et al. (2013). Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res*, 23(12), 2149-2157.
- Schoeftner, S., & Blasco, M. A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, 10(2), 228-236.
- Schoeftner, S., & Blasco, M. A. (2010). Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. *Semin Cell Dev Biol*, 21(2), 186-193.
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33(5), 787-791.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 72-76.
- Smirnova, A., Gamba, R., Khoriauli, L., Vitelli, V., Nergadze, S. G., & Giulotto, E. (2013). TERRA Expression Levels Do Not Correlate with Telomere Length and Radiation Sensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Front Oncol*, 3, 115.

- Tong, A. S., Stern, J. L., Sfeir, A., Kartawinata, M., de Lange, T., Zhu, X. D., et al. (2015). ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. *Cell Rep*, 13(8), 1633-1646.
- Tyagi, S., & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14(3), 303-308.
- Wang, X., Goodrich, K. J., Gooding, A. R., Naeem, H., Archer, S., Pauczek, R. D., et al. (2017). Targeting of Polycomb Repressive Complex 2 to RNA by Short Repeats of Consecutive Guanines. *Mol Cell*, 65(6), 1056-1067 e1055.
- Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., et al. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, 17(4), 498-502.
- Xu, Y., Ishizuka, T., Yang, J., Ito, K., Katada, H., Komiyama, M., et al. (2012). Oligonucleotide models of telomeric DNA and RNA form a Hybrid G-quadruplex structure as a potential component of telomeres. *J Biol Chem*, 287(50), 41787-41796.
- Xu, Y., Suzuki, Y., Ito, K., & Komiyama, M. (2010). Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33), 14579-14584.
- Yamada, T., Yoshimura, H., Shimada, R., Hattori, M., Eguchi, M., Fujiwara, T. K., et al. (2016). Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres. *Sci Rep*, 6, 38910.
- Yeager, T. R., Neumann, A. A., Englezou, A., Huschtscha, L. I., Noble, J. R., & Reddel, R. R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*, 59(17), 4175-4179.
- Yehezkel, S., Segev, Y., Viegas-Pequignot, E., Skorecki, K., & Selig, S. (2008). Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet*, 17(18), 2776-2789.
- Yu, T. Y., Kao, Y. W., & Lin, J. J. (2014). Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(9), 3377-3382.
- Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., & Prescott, D. M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, 350(6320), 718-720.
- Zhang, L. F., Ogawa, Y., Ahn, J. Y., Namekawa, S. H., Silva, S. S., & Lee, J. T. (2009). Telomeric RNAs mark sex chromosomes in stem cells. *Genetics*, 182(3), 685-698.

Annexes

Annexe 1 : Séquences des amorces de RT-qPCR et RT-PCR pour détecter TERRA

TERRA RT	CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA
Tel15q-S1	GCAGCGAGATTCTCCCAAGC
Tel15q-AS	TAACCACATGAGCAATGTGGGTG
Tel15q-MS2-AS	ATGTTTCTGCATCGAAGGCATTAGG
MS2-3'-AS (PCR)	GGGTACCGAGCTCAATGT

Annexe 2 : Origine des anticorps utilisés dans cette étude

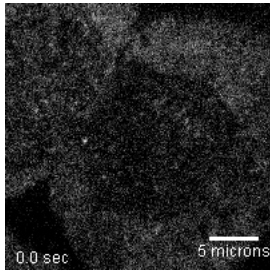
Anticorps primaire	Référence
Anti TRF2	Novusbio - NB 110-57130-Rabbit
Anti hnRNP-A1	Abcam - ab5832 Mouse
Anti ATRX	Novusbio -NBP-132851 Rabbit
Anti GFP	Roche
Anti FUS	Abcam -ab 23439 Rabbit

Anticorps secondaire	
ECL-anti Rabbit IgG	GE-Healthcare-NA-934
ECL-anti Mouse	GE-Healthcare -NA-931

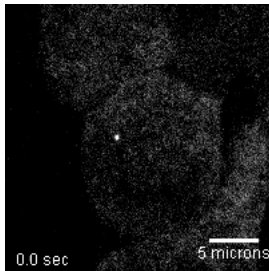
**Annexe 3 : Vidéos/ time-lapse des deux types populations de TERRA (particules et foci)/
Visualisation des interactions TERRA : télomères**

<https://www.tandfonline.com/doi/suppl/10.1080/15476286.2018.1456300>

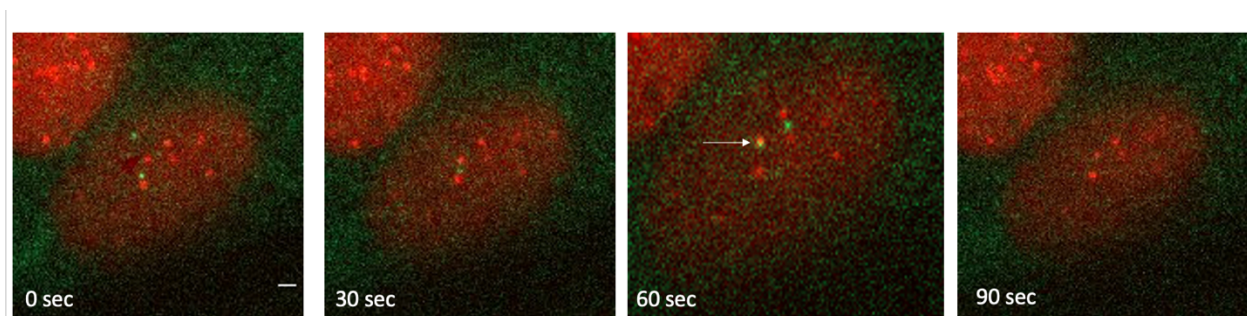
Les vidéos des particules et foci de TERRA sont disponibles à partir de ce lien, elles figurent dans le matériel supplémentaire de l'article Avogaro, RNA Biology, 2018.



Vidéo de particules de TERRA dans le noyau des cellules AGS



Vidéo de foci de TERRA dans le noyau des cellules AGS



Time-lapse montrant l'interactions TERRA : télomère

Un film avec des intervalles d'acquisition de 30 secondes a été réalisé dans tout le plan de la cellule (Z stack) pour ne manquer aucun évènement de colocalisation TERRA : télomères. Les plans focaux montrant un évènement de colocalisation TERRA : télomère ont été séparés en panneaux de 0 à 90 secondes. La flèche à 60 sec représente la colocalisation d'un foci TERRA et d'un télomère. Échelle : 1µm.