

Université de Montréal

**Étude de la régulation de la télomérase par imagerie en molécules
uniques**

Par

MAGUEMOUN KAMÉLIA

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 génétique moléculaire.

Août 2022

© Kamélia Maguemoun, 2022

Université de Montréal

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Étude de la régulation de la télomérase par imagerie en molécules uniques

Présenté par

Kamélia MAGUEMOUN

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

Daniel Zenklusen
Président-rapporteur

Pascal Chartrand
Directeur de recherche

Jean-Claude Labbé
Membre du jury

Résumé

La télomérase est un facteur clé dans la tumorigénèse vu son rôle dans le maintien de l'intégrité chromosomique. Cet enzyme est une ribonucléoprotéine constituée d'un ARN non-codant (hTR), qui contient la séquence matrice pour la synthèse des télomères et qui agit comme squelette pour l'assemblage des sous-unités protéiques. Parmi ceux-ci, nous retrouvons particulièrement la protéine hTERT, la sous-unité catalytique qui possède l'activité rétrotranscriptase. L'activité de cet enzyme est principalement déterminée par sa maturation ainsi que par son recrutement aux télomères. Au cours de ce processus, la télomérase interagit avec plusieurs effecteurs dont la coordination, bien qu'importante, demeure peu comprise. Suite à la transcription de l'ARN non-codant hTR, la maturation de la télomérase s'effectuerait en partie au nucléole. La télomérase serait ensuite transportée aux corps de Cajal (CB) pour terminer la biogénèse du complexe. Il a été proposé que la protéine TCAB1 jouerait un rôle à cette étape. Enfin, le recrutement de la télomérase mature aux télomères est modulé par son interaction avec le complexe *shelterin* présent aux télomères. Des études ont montré que la protéine POT1, qui interagit avec la partie simple-brin du télomère et inhibe le recrutement de la télomérase aux télomères, est mutée dans certains cancers présentant une élongation anormale des télomères.

Bien qu'il soit proposé que l'assemblage des sous-unités hTERT et hTR s'effectuerait aux CB, il n'y a pas de consensus sur l'enchaînement des étapes qui conduisent à cet assemblage. Une fois la télomérase assemblée, son accès aux télomères est contrôlé, notamment par la protéine POT1. Des mutations de POT1, tel que K90E, sont observées dans des cancers, mais l'impact de telles mutations sur l'accès de la télomérase aux télomères reste inconnu. Deux hypothèses ont donc été posées : 1) Une étape dans la maturation de la télomérase est favorisée au niveau du nucléole par la liaison de hTR à TCAB1, qui permettrait son trafic du nucléole vers les CB. 2) La mutation K90E dans POT1 augmenterait le recrutement de la télomérase aux télomères.

Notre laboratoire a développé un système qui permet de marquer l'ARN hTR avec la GFP de manière à permettre l'imagerie de molécules unique en temps réel dans les cellules et ainsi étudier les interactions de la télomérase avec différents effecteurs. Dans ce projet, un pipeline d'analyse d'image, DCTracker, a été développé pour automatiser l'analyse d'image. 1) Des expériences de microscopie en temps réel sur cellules vivantes permettront d'observer les changements dans le recrutement de hTR aux télomères lorsque POT1 présente la mutation K90E

identifiée dans certains cancers par rapport à POT1 sauvage. 2) TCAB1, fusionné à un HaloTag, sera marqué par Janelia Fluor 646 et de l'imagerie sur un microscope à haute résolution par la méthode HiLo sera faite pour détecter les molécules uniques de hTR et TCAB1, et évaluer leur colocalisation dans le nucléole et aux CB.

Les résultats obtenus ont montré une différence dans le recrutement de hTR aux télomères lorsque POT1 présente la mutation ponctuelle K90E. Aussi, il a été possible d'imager et de localiser des particules uniques de TCAB1 dans le noyau des cellules à l'étude. D'une part, ces résultats ont permis de suggérer qu'une partie de la biogénèse de la télomérase se déroule au nucléole, et d'autre part ils ont permis d'identifier l'importance de la lysine 90 de POT1 dans la répression du recrutement de la télomérase aux télomères.

Mots-clés : télomères, télomérase, hTR, TCAB1, POT1, cancer, imagerie en temps réel, cellules vivantes, microscopie.

Abstract

Telomerase is a key enzyme in tumorigenesis due to its role in maintaining chromosomal integrity. This enzyme is a ribonucleoprotein complex consisting of a non-coding RNA (hTR), which contains the template sequence for telomere synthesis, and which acts as a backbone for the assembly of protein subunits. Among these, we particularly find the hTERT protein, the catalytic subunit which possesses the reverse transcriptase activity. The activity of this enzyme is mainly determined by its maturation as well as by its recruitment to telomeres. During this process, telomerase interacts with several effectors which coordination, although important, remains poorly understood. Following transcription of hTR, telomerase maturation takes place partly at the nucleolus. Telomerase would then be transported to the Cajal bodies (CB) to complete its biogenesis. It has been proposed that the protein TCAB1 plays a role at this step. Finally, the recruitment of mature telomerase to telomeres is modulated by its interaction with the shelterin complex present at telomeres. Studies have shown that the protein POT1, which interacts with the single-stranded extremity of the telomere and inhibits telomerase recruitment to telomeres, is mutated in some cancers with abnormal telomere elongation.

Although it is proposed that the assembly of the hTERT subunits and hTR would take place at the CBs, there is no consensus on the different steps that lead to this assembly. Once telomerase is assembled, its access to the telomeres is controlled by members of the Shelterin complex, including POT1. POT1 mutations, such as K90E, are observed in several cancers, but the impact of such mutations on telomerase access to telomeres remains unknown. We hypothesized that: 1) A step in telomerase maturation is promoted in the nucleolus by the binding of hTR to TCAB1, which would allow its trafficking to CBs. 2) The K90E mutation in POT1 would increase telomerase recruitment to telomeres.

Our laboratory has developed a system that allows the labeling of hTR RNA with GFP in order to perform imaging of single molecules of hTR in real time in living cells and thus study the interactions of telomerase with different effectors. In this project, we also developed a data analysis pipeline (DCTracker) to automatize the image analysis. 1) Real-time microscopy experiments on live cells will allow us to observe the changes in the recruitment of hTR to telomeres when POT1 has the K90E mutation identified in certain cancers compared to the wild type. 2) TCAB1, fused

to a HaloTag, will be labeled with JaneliaFluor 646 and imaged on a high-resolution Hilo microscope to detect single molecules of hTR and TCAB1, and assess their colocalization in the nucleolus and CBs.

Our results revealed an increased recruitment of hTR at telomeres when POT1 presents the point mutant K90E. Also, we were able to image and localize single particle of TCAB1 in the nucleus of the cells. These results suggest that part of the biogenesis of telomerase takes place in the nucleolus, and they underline the role of lysine 90 of POT1 in the repression of telomerase recruitment to telomeres.

Keywords : telomeres, telomerase, hTR, TCAB1, POT1, cancer, live cell imaging, image analysis, microscopy

Table des matières

<i>Résumé</i>	3
<i>Abstract</i>	5
<i>Table des matières</i>	7
<i>Liste des tableaux</i>	9
<i>Liste des figures</i>	10
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	11
<i>Remerciements</i>	14
Chapitre 1 – INTRODUCTION	16
I. Télomères	16
a. Structure et fonction des télomères.....	16
b. Interactome des télomères.....	17
II. Télomérase	21
a. Structure et fonction de la télomérase.....	21
i. Human telomerase RNA : hTR.....	22
ii. Human Telomerase reverse transcriptase: hTERT.....	23
b. Interactome de la télomérase.....	24
i. Telomerase Cajal Body Protein 1 : TCAB1.....	24
ii. Complexe ribonucléoprotéique H/ACA.....	25
iii. Histones H2A et H2B.....	25
III. Biogénèse de la télomérase	26
a. Synthèse de hTR.....	26
b. Maturation et localisation de hTR.....	27
i. Au site de transcription.....	27
ii. Dans le nucléole.....	27
iii. Dans les Cajal Bodies.....	28
c. Assemblage de la télomérase.....	29
IV. Recrutement de la télomérase aux télomères	30
a. Les principaux « protagonistes ».....	30
i. TPP1 et POT1 du complexe de la shelterin.....	30
ii. Domaines TEN et motif TRAP de hTERT.....	33
b. Régulation du recrutement de la télomérase aux télomères.....	35
i. Promotion du recrutement de la télomérase aux télomères.....	35
ii. Répression du recrutement de la télomérase aux télomères.....	36
V. Imagerie de molécules uniques en cellules vivantes	37
a. Imagerie des cellules vivantes en temps réel.....	37
b. Le système MS2 pour marquer l'ARN hTR.....	38

c. L'étiquette HaloTag® pour marquer les protéines	39
d. Étude de la télomérase par imagerie en molécules uniques	40
e. Analyse des données d'imagerie moléculaire	42
VI. Problématique et hypothèse.....	43
VII. Objectifs et approche expérimentales.....	43
Chapitre 2 – Matériel et Méthode	46
Réactifs et ressources.....	46
Clonage moléculaire	47
Culture cellulaire et développement des lignées cellulaires.....	48
Marquage JaneliaFluor.....	49
Tri cellulaire induit par fluorescence (FACS)	49
SDS-PAGE et Immunobuvardage de type Western.....	50
Immunofluorescence	50
Transfection cellulaire.....	51
Imagerie cellulaire au microscope.....	51
Analyse d'image	52
Analyse statistique	53
Chapitre 3 – Résultats.....	54
Programme d'analyse d'images	54
Effet de la mutation POT1-K90E sur le recrutement de la télomérase aux télomères.....	57
Effet de la protéine TCAB1 sur la localisation de hTR.....	65
Chapitre 4 – Discussion.....	71
Un programme de quantification qui facilite l'analyse d'image	71
Localisation et biogénèse de hTR.....	73
La surexpression de hTERT facilite l'étude du recrutement de hTR aux télomères	75
POT1 régule le recrutement de la télomérase aux télomères	76
Conclusion	78
Références.....	80

Liste des tableaux

Tableau 1 : Réactifs et matériel utilisés	46
Tableau 2 : Dilution de lentivirus utilisées pour générer les lignées cellulaires.....	49

Liste des figures

Figure 1 : Le télomère et son interactome.	17
Figure 2 : Organisation du complexe <i>shelterin</i> (excluant RAP1).....	18
Figure 3 : Problème de répliation des extrémités de l'ADN.....	20
Figure 4 : Structure secondaire de hTR.	21
Figure 5 : Structure cryo-EM de la télomérase humaine.	23
Figure 6 : Les différents domaines de hTERT.....	24
Figure 7 : Domaines de la protéine TCAB1.	24
Figure 8 : Structure du noyau catalytique de la télomérase.....	31
Figure 9 : Variants germinaux rares dans POT1 identifiés dans les cancers familiaux.....	33
Figure 10 : Structure de la télomérase humaine avec TPP1.	35
Figure 11 : L'ARN hTR marqué avec des tiges-boucles MS2 à son extrémité 5'.	38
Figure 12 : L'étiquette HaloTag, un puissant outil pour marquer les protéines d'intérêt.....	40
Figure 13 : Modèle de la dynamique de hTR aux télomères.....	41
Figure 14 : Organigramme du pipeline DCTracker.....	55
Figure 15 : Algorithme de DCTracker.....	56
Figure 16 : L'analyse automatique DCTracker confirme les résultats obtenus par Laprade <i>et al.</i>	57
Figure 17 : Validation de l'expression et de la localisation de la protéine myc-POT1.	59
Figure 18 : Le suivi des particules de hTR est possible seulement dans le cas où hTERT est surexprimé.....	61
Figure 19 : Les mutants de POT1 ont une incidence sur le recrutement de la télomérase aux télomères.	64
Figure 20 : Les mutants de POT1 ont une incidence sur les interactions longues entre la télomérase et les télomères.	65
Figure 21 : Validation de l'expression et de la localisation de la protéine Halo-TCAB1.	67
Figure 22 : Validation de l'expression de la protéine Halo-TCAB1 exprimé avec un promoteur plus faible.....	69

Liste des sigles et abréviations

μm : micromètre	KO: Knock Out
μg : microgramme	LncA RN : longs ARN non codant
ADN: Acide Désoxyribonucléique	MCP : MS2 Coat protein
ALT: Alternative Lengthning of Telomeres	MMG: monométhylguanosine
ARN : Acide ribonucléique	NF-Y: Nuclear transcription factor Y
ARN nc : ARN non codant	NHEJ: Non-Homologous End-Joining
ATM: ataxia telangiectasia mutated	nm: nanomètre
ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	NOP10: Nucleolar protein 10
C: cytosine	OB: Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding
CB: Cajal Body	pb: paire de bases
Cryo -EM: Cryo microscopie électronique	PARN: Poly(A)-specific ribonuclease
C TE : C-Terminal Extension	PAPD5: poly(A)polymérase non canonique
DC: Dyskératose congénitale	PCR: Polymerase chain reaction
DDR: Réponse aux Dommages à l'ADN	POT1: Protection of telomere 1
DKC1: Dyskerine	RAP1: Repressor/Activator Protein 1
DSB: double strand breaks	RNP : ribonucléoprotéine
FISH: Fluorescent in situ hybridization	RT : rétro-transcriptase
G: guanine	RTEL1: Regulator of Telomere Elongation Helicase 1
(sf)-GFP: (super folder)-Green fluorescent protein	s: seconde
HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1	scaRNA : ARN spécifiques aux corps Cajal
HR: Recombinaison Homologue	SMLM: Single molecule localisation microscopy
hTR: Human Telomerase RNA	snoARN : petits ARN nucléolaires
hTERT: human Telomerase Reverse transcriptase	Sp1: specificity protein 1
IF: Immuno-Fluorescence	SPT: Single particle Tracking
Kb: Kilobase	TCAB1: Telomerase and Cajal body protein
kDa: Kilodalton	1

TERC: Telomerase RNA component
TEN: Telomerase Essential N-terminal domain
TGS1: triméthylguanosine synthase 1
TIN2: TRF1-interacting nuclear protein 2
TOE1: Target of EGR1 protein 1
TPP1: TIN2 and POT1 interacting protein 1

TRBD: Telomerase RNA Binding Domain
TRF1: Telomere repeat binding Factor 1
TRF2: Telomere repeat binding Factor 2
WRAP53: WD40-encoding RNA antisense to p53
WDR79: WD repeat-containing protein
WT : Wild type

*À vous, papa, maman, et à vos nombreux sacrifices qui ont fait de moi ce que je suis
aujourd'hui.*

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pascal Chartrand. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire depuis mon stage du baccalauréat jusqu'à la fin de cette maîtrise. Merci de m'avoir donné un projet de recherche qui a toujours été stimulant et qui m'a toujours poussé à aller loin (parfois même trop loin...). Aussi, merci de m'avoir accordé une liberté et une autonomie sur les différents aspects de ma recherche. Enfin, merci d'avoir toujours eu le temps de discuter avec moi au sujet de mon projet et de m'avoir guidé et accompagné dans toutes les étapes qui ont fait le moi la scientifique je suis maintenant.

Le laboratoire de Pascal a toujours été un endroit où je me sentais comme chez moi, et évidemment ça n'aurait pas été possible sans la présence des membres du laboratoire. Tout d'abord Emmanuelle Querido, ma mentor, celle qui m'a appris tout ce que je sais, qui m'a enseigné la rigueur scientifique et qui a toujours été disponible pour discuter et m'aider sur les divers aspects de mon projet. Je remercie Yani Bouaziz un collègue qui est vite devenu un ami, avec qui j'ai apprécié échanger et partager sur de nombreux sujets, scientifiques ou personnels. Merci à Maxime Lalonde, qui était encore là au début de mon parcours et qui a toujours su trouver la solution à mes problèmes de débutants. Merci à Hadrien Laprade pour tout le travail qu'il a fait sur ce projet avant qu'il ne devienne mien, et pour son aide au début de ma maîtrise.

Je voudrais aussi remercier tout le personnel du département de biochimie et médecine moléculaire sans qui l'ambiance de travail n'aurait pas été la même. Un merci spécial à Robert pour son enthousiasme, sa joie de vivre communicative et sa fameuse phrase « On ne lâche pas ! » qui, je suis sûre, a permis à tout le monde de ne rien lâcher !

Merci aux membres de mon jury Dr. Daniel Zenklusen et Dr. Jean-Claude Labbé d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de fin d'étude.

Merci aux amis que j'ai pu me faire à l'université qui ont pu m'aider à me déconnecter lorsque j'en avais besoin, entre autres Roxana, Marie, Hiba, Samy, Lise, Justina, Elena et Sarah.

J'aimerais maintenant remercier ma famille, Maman, Papa, Massil et Nina, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenu quelle que soit la situation, de m'avoir enduré pendant les périodes stressantes (et moins stressantes), de m'avoir secoué quand j'en avais besoin (surtout vous Maman et Nina) et de m'avoir toujours poussé à être meilleure.

Enfin, j'aimerais remercier Samuel Prince. Merci pour ta grande aide sur mon projet, merci de m'avoir aidé à mettre au point DCTracker, et d'avoir accepté de l'écrire. Merci de tout le soutien que tu m'as apporté pendant tout mon cursus universitaire. *From lab partner to life partner*. Merci d'être à mes côtés depuis près de 5 ans et de m'avoir supportée pendant tout ce temps même si j'ai à maintes reprises défié tes nerfs. Merci d'avoir toujours trouvé les bons mots pour me reconforter lorsque j'en avais besoin. C'est grâce à ton soutien, ta générosité, ta patience, ta bienveillance et ton amour que ma volonté de persévérer et de réussir est présente. J'ai hâte de passer les prochaines étapes de ma vie avec toi.

Chapitre 1 – INTRODUCTION

Le cancer est une maladie complexe qui existe depuis très longtemps et qui est malheureusement encore d'actualité aujourd'hui. Un des aspects communs à la majorité des cancers, et qui est un évènement clé de la cancérogénèse, est l'immortalisation des cellules cancéreuses qui est régie par la réactivation de la télomérase. Cette dernière est une reverse transcriptase qui permet de maintenir les extrémités des chromosomes en allongeant les télomères. Dans près de 90% des cancers, la télomérase est réactivée et entraîne l'allongement des télomères permettant l'immortalisation des cellules (1). Les 10% restants sont des cancers dont le mécanisme repose sur la voie ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), qui implique la recombinaison homologue pour maintenir la longueur de leurs télomères (2).

I. Télomères

a. Structure et fonction des télomères

Les télomères sont des séquences répétées à l'extrémité des chromosomes et sont essentiels à la stabilité et à l'intégrité chromosomique (3). En effet, les télomères empêchent que les extrémités chromosomiques soient reconnues comme des bris dans l'ADN double-brin, permettant ainsi de prévenir de potentielles fusions chromosomiques (4). Les télomères sont composés de répétitions en tandem (motif TTAGGG chez les vertébrés) d'une longueur variable selon les espèces (3,5). Dans les cellules humaines, la longueur de la séquence télomérique va de 5 à 15 kilobases (kb) (5). Cependant, la longueur minimale requise pour que les télomères puissent remplir leur rôle dans la protection des extrémités chromosomiques est d'environ 400 paires de bases (6,7). La région télomérique est une structure majoritairement double-brin qui se termine par une région simple brin, nommée protrusion 3', qui se trouve sur le brin nommé brin riche en G (8). La longueur de la protrusion 3' peut varier entre 50 et 500 nucléotides chez les mammifères (9). L'autre brin qui est toujours engagé dans une liaison double-brin se nomme brin riche en C (9). Pour pouvoir protéger les extrémités des chromosomes, les télomères forment une structure

secondaire particulière qui se nomme boucle T ou *T-loop* (10), et grâce à la protrusion 3' qui vient se replier sur lui-même, une structure en boucle D ou *D-loop* se forme (Figure 1) (10).

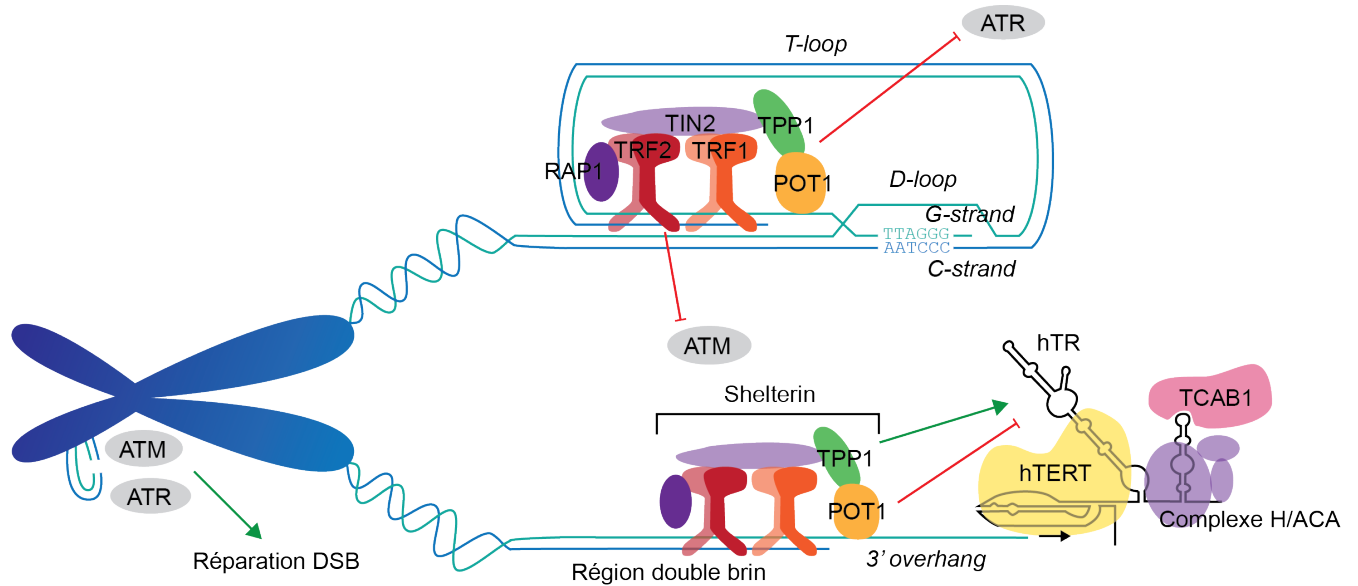


Figure 1: Le télomère et son interactome. L'ADN télomérique est lié par le complexe *shelterin*. Ce dernier, composé des protéines TRF1, TRF2, TPP1, POT1, TIN2 et RAP1, permet la protection de l'extrémité des chromosomes en participant à la formation de la boucle T (*T-loop*). Le brin riche en G (*G-strand*) de la protrusion 3' (*3' overhang*) participe à la formation de la boucle D (*D-loop*) et permet de stabiliser la boucle T en même temps. La *shelterin* protège aussi les télomères de la réparation des DSB (*Double Strand Break* ou bris double brin) en inhibant les kinases ATM et ATR qui activent les voies de réparation des DSB. La protéine TPP1 permet le recrutement de la télomérase aux télomères, tandis que POT1 permet sa répression. La flèche noire indique le sens de l'extension des télomères par la télomérase.

b. Interactome des télomères

Les télomères sont associés à un certain nombre de protéines qui forment un complexe nommé *shelterin* (9) (Figure 1). Ce complexe protéique permet le maintien de la *T-loop* ainsi que la distinction entre les extrémités chromosomiques et les bris double-brins (9). En effet, le complexe *shelterin* empêche ainsi l'activation des voies de réparation des bris double-brins de l'ADN au niveau de l'extrémité des chromosomes (9). Ces réponses incluent notamment la jonction d'extrémités non-homologues (*Non-Homologous End-Joining* ou *NHEJ*), la jonction

d'extrémités non-homologues alternative (*Alternative Non-Homologous End-Joining* ou *Alt-NHEJ*) et la recombinaison homologue (9,11).

Le recrutement du complexe *shelterin* aux télomères est favorisé par les protéines *Telomeric binding factor 1 and 2* (TRF1 et TRF2) qui reconnaissent la séquence des répétitions télomériques (Figure 1, 2) (12). Ces protéines recrutent ensuite les autres effecteurs protéiques du complexe : *TRF1- and TRF2- Interacting Nuclear protein 2* (TIN2), *Repressor/Activator Protein 1* (Rap1), *Protection Of Telomeres 1* (POT1) et *Adrenocortical dysplasia protein homolog* (TPP1) requis pour l'activité et la stabilisation du complexe (Figure 1, 2) (13). TIN2 est particulièrement importante pour stabiliser TRF1 et TRF2 sur le télomère (14). En effet, l'absence de cette protéine cause une déstabilisation du complexe, ce qui diminue la quantité des protéines TRF2 et POT1-TPP1 aux télomères. Ces dernières sont quant à elles impliquées dans l'inactivation des voies de réparation des dommages à l'ADN (15,16). En effet, il a été proposé que TRF2 inhibe la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (17,18), alors que POT1-TPP1 inhibe la kinase ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) (16,18), deux kinases impliquées dans les voies de signalisation des dommages à l'ADN.

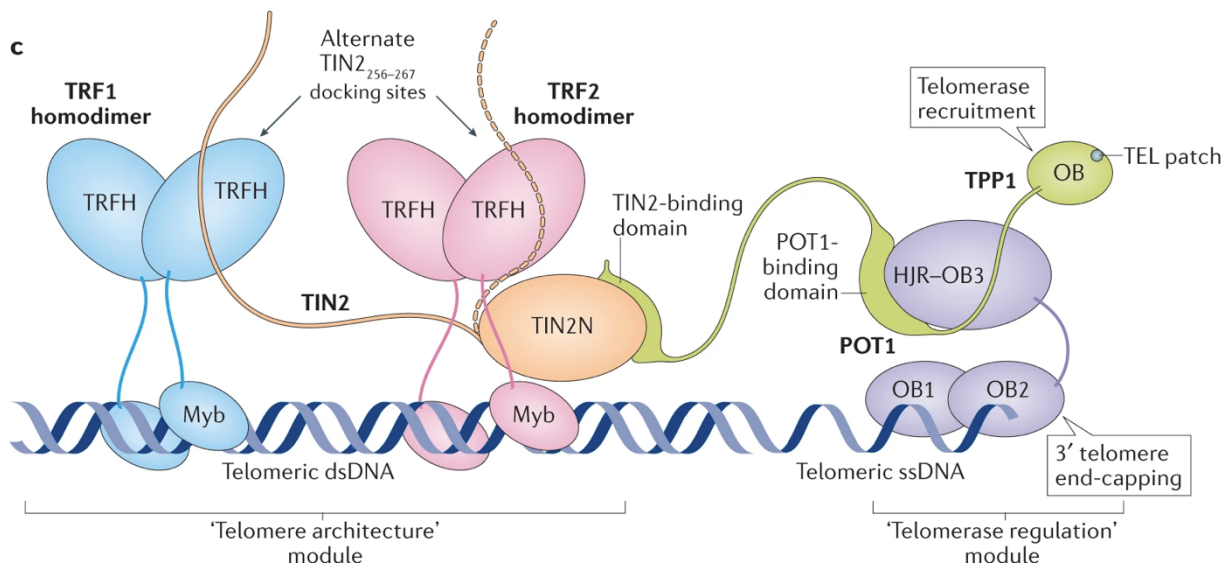


Figure 2 : Organisation du complexe *shelterin* (excluant RAP1). Les régions non structurées sont illustrées par les régions flexibles de chaque protéine. Le complexe *shelterin* assemblé (excluant RAP1) comprend deux modules structurellement séparés : le module d'architecture des télomères (TRF1-TIN2-TRF2-RAP1) et le module de régulation de la télomérase (TPP1-POT1). Le domaine N-terminal TIN2 (TIN2N, en orange) interagit uniquement avec TRF2 (rose) alors

que son domaine C-terminal interagit avec TRF1 (bleu) et/ou TRF2 (bras pointillé orange). TPP1 (vert) interagit avec TIN2, POT1 (violet) et hTERT (domaine OB vert/TEL patch). Les domaines OB-fold 1 et 2 de POT1 interagissent avec l'ADN simple brin. Tirée de Lim and Cech, 2021 (19).

c. Maintenance et division des télomères

Dans les cellules somatiques, au fil des divisions cellulaires, les télomères deviennent de plus en plus courts à cause du problème de réplication aux extrémités, soit l'impossibilité pour la cellule de synthétiser le brin discontinu des chromosomes lors de leur réplication (20). En effet, à la fin de la réplication de l'ADN télomérique, à cause de la dégradation de l'amorce qui a été mise sur le brin discontinu par l'ADN primase pour permettre la synthèse des brins d'Okasaki et l'incapacité de l'ADN polymérase de synthétiser l'ADN dans cette partie, il y a une perte du matériel génétique qui engendre un brin 5' plus court et un brin 3' dépassant (20,21). Il s'agit là du problème de fin de réplication (20). Ainsi, au cours des divisions cellulaires, les télomères se retrouvent de plus en plus courts, jusqu'à atteindre une limite qui affecte la capacité des cellules à se diviser : la limite de Hayflick (22) (Figure 3).

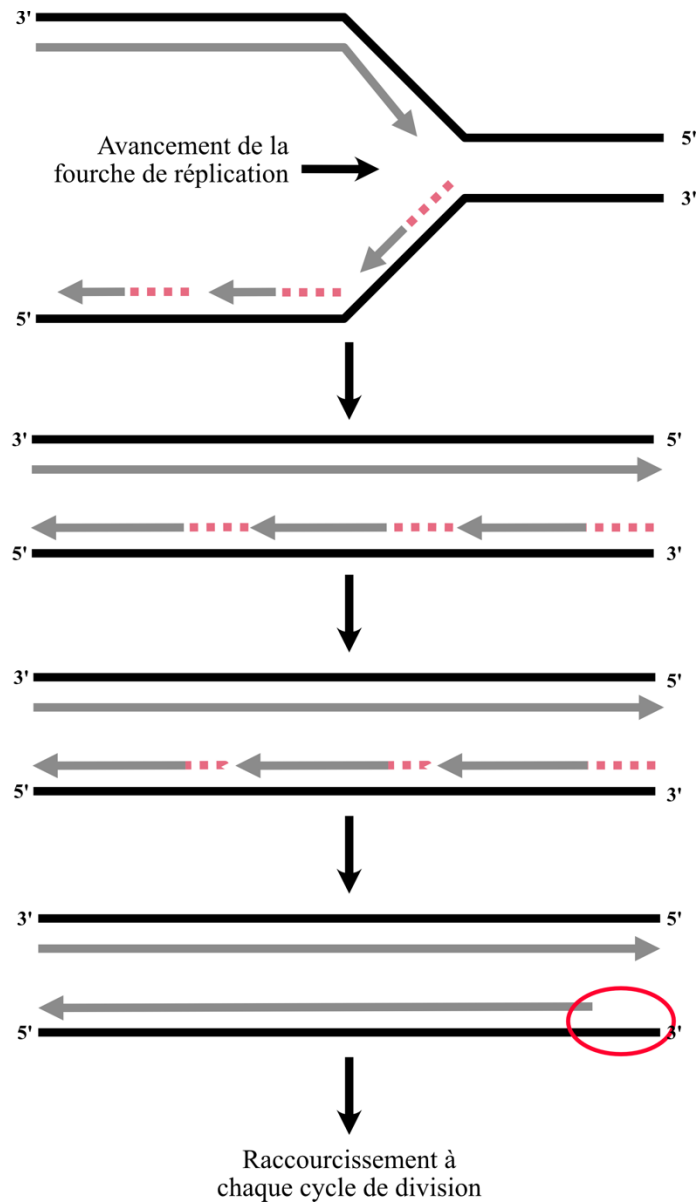


Figure 3: Problème de réplication des extrémités de l'ADN. Après le passage de la fourche de réplication, les amorces à ARN (rose) sont fabriquées par l'ARN primase. Ceux-ci sont ensuite étendus par l'ADN polymérase pour former des fragments d'Okazaki. Lorsque ces amorces d'ARN sont retirées, il n'y a pas de moyen de synthétiser une séquence du brin retardé qui soit complémentaire à la petite région à l'extrémité du chromosome (encerclé en rouge). Ainsi, au cours de la division cellulaire, la séquence est perdue aux extrémités des chromosomes. Adaptée de Wellinger (23).

Lorsque les télomères atteignent une longueur critique, cela aboutit à la sénescence cellulaire, un état dans lequel les cellules ne peuvent plus se répliquer, et éventuellement à l'apoptose (22,24).

Pour remédier au problème de raccourcissement des télomères dans les cellules qui doivent conserver leur capacité de réplication, telles que les cellules germinales et les cellules souches, les télomères doivent être allongés après chaque cycle de réplication grâce à une enzyme spécialisée nommée télomérase (24).

II. Télomérase

a. Structure et fonction de la télomérase

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) qui est responsable du maintien des extrémités des chromosomes en allongeant les télomères chez la majorité des eucaryotes (25). Elle a été découverte en 1985 par Carol W. Greider et Elizabeth H. Blackburn (25). Elle est constituée notamment d'une transcriptase inverse nommée hTERT et d'un long ARN non-codant (lncARN) nommé hTR (Figure 4) (25).

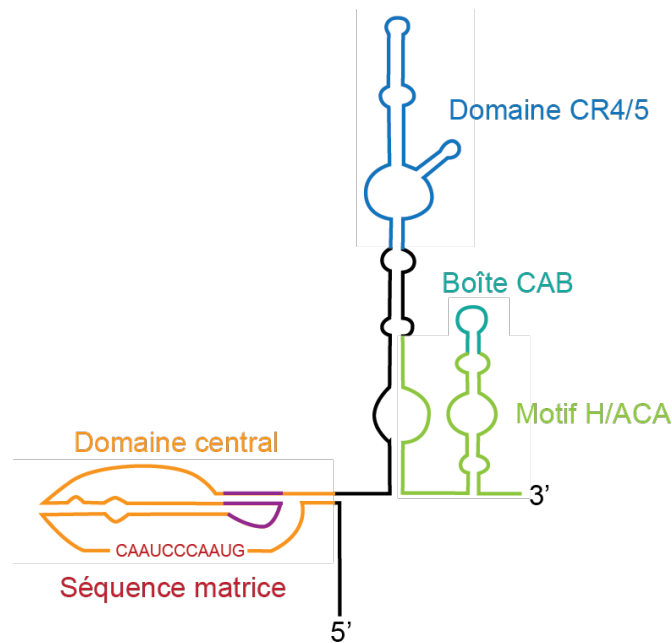


Figure 4: Structure secondaire de hTR. Le domaine H/ACA est en vert et comprend la boîte CAB. Le domaine CR4/5 est en bleu. Le domaine central est en orange et comprend un pseudo-nœud (en violet) et la séquence matrice (en rouge). La protéine hTERT lie le pseudo-nœud et la tige boucle CR4/5. Adaptée de Nguyen et al. (26).

i. Human telomerase RNA: hTR

L'ARN hTR, aussi connu sous le nom de TERC (*Telomerase RNA Component*) constitue l'armature de la télomérase (Figure 4) (5). Une structure secondaire conservée chez les vertébrés de cet ARN a initialement été déterminée sur la base de 35 séquences (27), avec quatre domaines structuraux conservés proposés : la séquence matrice pour la synthèse des télomères, le domaine pseudo-nœud, une tige boucle qui permet l'interaction avec hTERT (domaine CR4/5) et une tige boucle du côté 3' qui présente une boîte CAB d'un côté et un motif H/ACA de l'autre sur lequel le complexe H/ACA se lie (Figure 4) (28,29). Dépendamment des espèces, la longueur de hTR peut varier de 150 nucléotides (nt) chez les Ciliés à 1150 nt chez *Saccharomyces cerevisiae*, ou encore à plus de 2000 nt chez le champignon *Neurospora crassa* (29). Chez l'humain, l'ARN hTR mature fait 451 nt (30). Cependant, malgré la différence de taille observée entre les différentes espèces, les propriétés fonctionnelles restent conservées (30). Tous les éléments de structure secondaires conservés chez TR se trouvent dans la région 5' de hTR, au niveau du domaine CR4/5 et du domaine pseudo-nœud (27,31,32). Ces deux domaines structuraux hautement conservés lient indépendamment hTERT (33,34) et sont les seuls éléments de hTR requis pour la reconstitution *in vitro* d'une télomérase catalytiquement active avec hTERT (34,35). L'extrémité 3' de hTR a été identifiée comme étant un domaine spécifique aux corps de Cajal, jouant un rôle important dans la biogénèse et la régulation de la télomérase *in vivo*, incluant sa maturation et sa localisation (36–39). En effet, ce lncARN contient un élément conservé de localisation au corps de Cajal (boîte CAB) (36) dans la boucle à l'extrémité 3' (30). Ainsi, la liaison de la protéine *Telomerase Cajal body protein 1* (TCAB1) à la boîte CAB permet la localisation de hTR dans le corps de Cajal (40,41) (Figure 5). L'ARN hTR se lie aussi à deux ensembles des quatre H/ACA RNP conservées durant l'évolution (dyskérine, Gar1, Nop10 et Nhp2) qui participent à l'assemblage de la télomérase mature (42) (Figure 5). De plus, il a récemment été découvert que les histones H2A-H2B font aussi partie du complexe télomérase (43) (Figure 5).

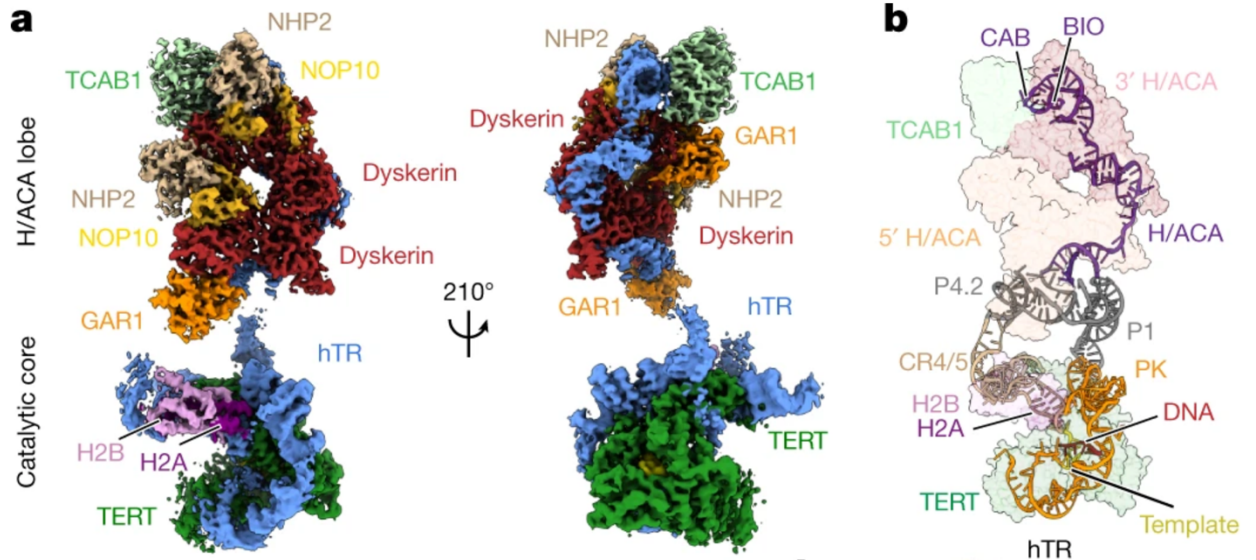


Figure 5: Structure cryo-EM de la télomérase humaine. a. Vues de face (gauche) et arrière (droite) des cartes cryo-EM des deux domaines de la télomérase : le noyau catalytique et le lobe H/ACA à 3,8 Å et 3,4 Å respectivement, avec des sous-unités colorées. b. Vue de face de la structure dans laquelle l'ARN hTR et le substrat d'ADN sont mis en évidence. Figure adaptée de Ghanim et al., 2021 (43).

ii. *Human Telomerase reverse transcriptase: hTERT*

La transcriptase inverse hTERT est le partenaire protéique essentiel de hTR qui permet l'ajout des répétitions télomériques (44). De plus, étant donné que son expression n'est pas élevée et est réprimée dans la majorité des cellules somatiques, cela fait d'elle le facteur limitant pour l'activation de la télomérase (45). Elle est composée de 1132 acides aminés et se divise en quatre domaines fonctionnels, à savoir le *Telomerase Essential N-terminal domain* (TEN), le *RNA Binding Domain* (RBD), le domaine rétrotranscriptase (RT) qui contient le *telomerase repeat addition processivity motif* (TRAP) et le domaine *C-Terminal Extension* (CTE) (44,46,47) (Figure 6). Le domaine TEN joue un rôle clé dans le recrutement de la télomérase aux télomères en interagissant avec la protéine TPP1 du complexe *shelterin* et permet aussi de catalyser la synthèse des répétitions télomériques (5). En effet, des mutations dans ce domaine ont révélé une réduction du recrutement de la télomérase aux télomères (48). Une étude récente a aussi révélé que le motif TRAP régule la processivité de la télomérase (47). Le domaine TRBD quant à lui est le domaine

essentiel pour l'interaction entre hTERT et hTR; l'interaction se fait au niveau du domaine CR4/5 et du domaine pseudo-nœud de hTR (44). Le domaine RT permet la synthèse des répétitions et forme avec le domaine CTE une structure permettant l'addition des TTAGGG de façon optimale (44).

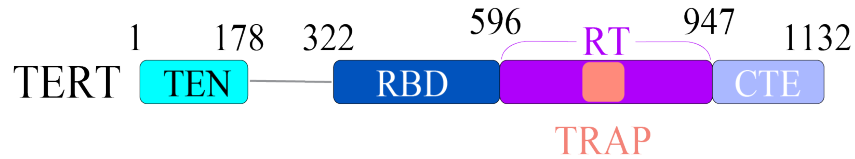


Figure 6: Les différents domaines de hTERT. La protéine hTERT est composée de quatre domaines fonctionnels : le domaine TEN (cyan), le domaine RBD (bleu), le domaine RT (violet) avec le motif TRAP (orange) et le domaine CTE (gris). Tirée de Liu et al., 2022 (46).

b. Interactome de la télomérase

Bien que l'ARN hTR et la protéine hTERT soient suffisants pour obtenir une télomérase fonctionnelle, d'autres protéines participent à ce complexe pour une télomérase complète et fonctionnelle de façon optimale (49,50) : TCAB1, le complexe H/ACA et l'hétérodimère d'histones H2A-H2B (43,49,50).

i. *Telomerase Cajal Body Protein 1: TCAB1*

TCAB1, aussi connu sous le nom de WRAP53 (*WD40-encoding RNA antisense to p53*) ou encore WDR79 (*WD repeat-containing protein 79*) est une petite protéine retrouvée dans le complexe de la télomérase mature et qui lie la boîte CAB retrouvée sur hTR (Figure 1,3) (40,41) Elle est constituée de trois domaines : un domaine riche en proline, un domaine WD40 et un domaine riche en glycine (Figure 7) (51).

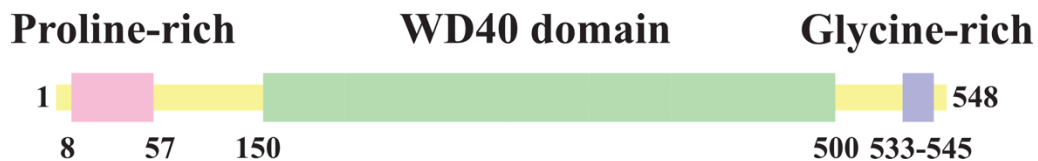


Figure 7: Domaines de la protéine TCAB1. La protéine TCAB1 est constituée d'un domaine N terminal riche en proline, d'un domaine central WD40 (qui lit la boîte CAB de l'ARNnc hTR pour

permettre l'assemblage de la télomérase aux CB) et d'un domaine riche en glycine en C terminal. Adaptée de Mahmoudi et al. (51).

Cette petite protéine de 543 acides aminés permet la localisation de la télomérase aux corps de Cajal (*Cajal bodies, CB*) où a lieu certaines étapes de maturation de la télomérase (5,41). De plus, des expériences d'immunoprécipitation faites sur des cellules qui n'exprimaient pas TCAB1 ont montré que l'absence de TCAB1 engendrait une réduction de l'association de hTERT au domaine CR4/5 de hTR, démontrant ainsi l'importance de la protéine TCAB1 dans le repliement correct de la tige boucle CR4/5 et dans le bon assemblage de la télomérase (50). D'ailleurs, une déplétion de TCAB1 par ARN interférents perturbe le recrutement de la télomérase aux télomères, une étape importante pour le fonctionnement de la télomérase (52–54).

ii. Complexe ribonucléoprotéique H/ACA

Le complexe ribonucléoprotéique H/ACA est recruté durant la transcription de l'ARN hTR grâce au domaine H/ACA de hTR (55). Des domaines H/ACA existent aussi chez d'autres ARN, notamment des petits ARN nucléolaires (snoARN), qui servent de guides pour la pseudouridylation des ARN ribosomiaux lorsqu'un complexe composé de NOP10, NHP2 et DKC1 (dyskerine) les lie (56). D'ailleurs la pseudouridylation, catalysée par la dyskerine, a des fonctions dans l'expression génique, l'épissage et la traduction et est une modification retrouvée chez plusieurs ARN (57). Au niveau de la tige-boucle retrouvée dans le domaine CR4/5 de hTR, il y a des sites potentiels de pseudouridylation, suggérant un rôle dans la stabilisation de la tige-boucle, mais aucune évidence quant à son rôle potentiel dans l'activité de la télomérase n'a encore été explorée (58). Il a été montré que des mutations de DKC1 résulte en une dégradation de hTR par l'exosome, tout comme des mutations au niveau du domaine H/ACA (59). Ceci induit donc une diminution du niveau de hTR et un raccourcissement des télomères, ce qui suggère que le recrutement de DKC1 sur hTR a un rôle important dans la stabilité et la maturation de la télomérase (59).

iii. Histones H2A et H2B

Les avancées récentes de la résolution de la structure du complexe de la télomérase humaine ont permis d'identifier l'hétérodimère d'histones H2A-H2B comme un partenaire

additionnel de ce complexe (Figure 5) (43). Cet hétérodimère se lie au domaine CR4/5 de la même manière qu'il lierait l'ADN nucléosomique, c'est-à-dire en utilisant la surface chargée positivement (Figure 5) (43). Des travaux antérieurs ont souligné que le domaine CR4/5 à lui seul adopte des conformations différentes (60), alors que dans les particules d'holoenzyme, il adopte une conformation plus régulière (43). Il a donc été suggéré que l'hétérodimère H2A-H2B pourrait agir pour stabiliser et/ou positionner le domaine CR4/5 pendant l'assemblage de la télomérase dans les cellules (43).

III. Biogénèse de la télomérase

En raison de son rôle dans la prolifération et l'immortalisation cellulaire, la biogénèse de la télomérase est un processus hautement régulé. Cette régulation est majoritairement attribuable à la régulation de l'expression des gènes hTR et hTERT et une dérégulation dans l'expression de ces gènes entraîne une dérégulation dans les niveaux de télomérase mature (61).

Cependant, le processus d'assemblage de la télomérase joue aussi un rôle dans la régulation des niveaux de télomérase mature et fonctionnelle. Cet assemblage s'effectue autour de l'ARNnc hTR qui sert d'échafaud et permet le recrutement de l'ensemble des composants de la télomérase mature lors du processus de maturation. Dans l'ensemble, l'assemblage de la télomérase se produit probablement à plusieurs sites dans le noyau, et des défauts dans ce processus peut entraîner sa mauvaise localisation (4).

a. Synthèse de hTR

Bien que hTR soit parfois défini comme un ARN spécifique aux corps Cajal (scaRNAs) ou un des petits ARN nucléolaires (snoRNAs) en raison de la présence du domaine H/ACA (4), le processus de transcription et de maturation de hTR diffère sensiblement de celui de ces ARN. En effet, chez l'humain l'ARNnc hTR est transcrit du gène TERC à partir de son propre promoteur par l'ARN polymérase II (62,63). La transcription est notamment régulée par les facteurs de transcription Sp1 (*specificity protein 1*), HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*) et NF-Y (*Nuclear transcription factor Y*), des régulateurs positifs de l'expression de hTR, ainsi que par Sp3 (*specificity protein 3*) qui régule négativement sa transcription (64,65).

Au cours de la transcription, hTR acquiert une coiffe mono-méthylguanosine (MMG) qui subit par la suite une hyperméthylation par l'enzyme tri-méthylguanosine synthase 1 (TGS1) pour donner une coiffe N², 2, 7 tri-méthylguanosine (TGM), qui est essentielle à la régulation du niveau et de la localisation de hTR (28). En effet, la déplétion de TGS1 cause une augmentation du niveau de hTR et de télomérase et par conséquent une augmentation de la longueur des télomères ainsi qu'une mauvaise localisation de hTR (28). Inversement, l'hyperméthylation de la coiffe de hTR inhibe l'accumulation de hTR, restreint les niveaux de télomérase assemblée et limite l'élongation des télomères (28).

Le mécanisme de terminaison de la transcription de hTR chez les vertébrés demeure peu compris, cependant il a été suggéré qu'il est effectué par un mécanisme impliquant le complexe Integrator, un complexe qui participe à la terminaison de la transcription des petits ARN nucléolaires (snRNA) (66,67). Le produit de cette transcription est une molécule précurseur d'environ 461 nucléotides qui sera ensuite modifiée post-transcriptionnellement pour produire la molécule de hTR mature de 451 nucléotides (68).

b. Maturation et localisation de hTR

i. Au site de transcription

La première étapes de maturation de hTR, ayant lieu rapidement après la transcription est la liaison du complexe H/ACA, composé en premier lieu des protéines *Dyskeratosis Congenita 1* (DKC1), *H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2* (NHP2), *H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3* (NOP10) et *H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1* (NAF1) qui se lie à une structure tige-boucle de hTR retrouvée du côté 3' (49). Subséquemment, NAF1 est remplacée par GAR1 dans le complexe H/ACA lors de la maturation de la télomérase (55,69).

ii. Dans le nucléole

Ensuite, comme le précurseur de hTR est synthétisé avec une longue extrémité 3', celle-ci doit se faire raccourcir pour produire la forme mature de 451 nucléotides (70). Puisque les facteurs qui participent à cette étape sont localisés au nucléole, elle est généralement considérée comme ayant lieu dans le nucléole (71). La présence d'une étape de maturation de hTR au nucléole

est aussi supportée par la présence transitoire de hTR dans le nucléole observée en microscopie sur des cellules vivantes (72). La voie typique de maturation de hTR implique une étape de oligo-adénylation suivie d'un clivage de l'ARN pour produire la forme mature. En effet, ces précurseurs sont d'abord oligo-adénylés par la poly(A)polymérase non canonique PAPD5 (73,74), puis peuvent soit être dégradés par le complexe exosome d'ARN, soit voir leur queue poly-A éliminée par la poly(A)ribonucléase PARN afin de pouvoir continuer leur maturation (28). La ribonucléase PARN a initialement été découverte comme un gène muté chez des personnes ayant des fibroses pulmonaires et des télomères courts, suggérant son implication fonctionnelle avec la télomérase (4). Ainsi, en l'absence de PARN, les précurseurs de hTR s'accumulent et sont ensuite dégradés, ce qui entraîne une diminution des niveaux de hTR et une réduction de l'activité de la télomérase (68). Cependant, en l'absence à la fois de PARN et de PAPD5, le niveau de hTR oligo-adénylé est considérablement plus faible et la maturation du transcrite de hTR se déroule normalement (68), indiquant la présence d'exonucléases 3'-5' supplémentaires qui permettent de raccourcir hTR dans sa forme mature sans nécessiter l'oligo-adénylation et de dé-adénylation (4). L'un de ces candidats serait l'exonucléase d'ARN 3'-5' TOE1 (*Target of EGR1 protein 1*) localisée dans le corps de Cajal, qui participe à la maturation des snRNA, des snoARN et des scaARN ainsi que des molécules précurseurs de hTR (75-77). L'ARN hTR peut aussi être dégradé par l'enzyme Exoribonucléase 1 (XRN1) dans le cytoplasme lorsqu'il se fait décoiffer par la *mRNA-decapping enzyme 2* (DCP2) (59). Ainsi, les transcrits de hTR subissent un processus de maturation en plusieurs étapes qui comprend des cycles d'adénylation et de désadénylation, qui maintiennent le niveau de hTR en équilibre (4). Ces mécanismes sont cruciaux pour la régulation des niveaux de télomérase, et bon nombre de ces étapes sont perturbées dans certaines pathologies (4).

iii. Dans les Cajal Bodies

Les corps de Cajal (CB) sont des organites sans membrane retrouvés dans le noyau et sont constitués de ribonucléoprotéines (RNP), en particulier les petits RNP nucléaires spliceosomal (snRNP) et de petits RNP nucléolaires (snoRNP) ainsi que de protéines (78). Ils sont impliqués dans des processus métaboliques différents liés à l'ARN, tels que la biogénèse et la maturation de petits ARN ou encore la maintenance des télomères (36,79). C'est un compartiment qui est structuré à l'aide de la protéine *coilin* qui, en interagissant avec les composantes des CB, permet

leur formation et leur maintien (80). La boîte CAB retrouvée dans différents scaRNA mais aussi dans hTR est reconnue par la protéine TCAB1 et permet leur adressage au CB (78). Ainsi, la localisation de hTR aux CB nécessite la liaison de TCAB1 à la séquence de la boîte CAB de la boucle en épingle à cheveux 3' de hTR (36,41,81). D'ailleurs, une récente étude a montré (à partir de résultats obtenus par FISH) que la déplétion de TCAB1 entraînait une accumulation de hTR dans le nucléole, suggérant que TCAB1 serait nécessaire pour empêcher l'accumulation de hTR dans le nucléole et permettre son assemblage avec hTERT (82). Cependant, dans ces mêmes cellules, lorsque hTR est surexprimé, le nucléole semble être saturé et l'excès de hTR peut s'assembler avec TERT et se localiser aux télomères, suggérant que TCAB1 n'est pas essentiel au recrutement de la télomérase aux télomères (82).

Il a initialement été avancé (à partir de résultats obtenus par FISH) que hTR réside aux CB pendant la majeure partie du cycle cellulaire (36,83). Cependant, l'idée que hTR est principalement localisé dans les CB a été remise en question par une récente étude qui utilise de l'imagerie en cellules vivantes, et a démontré que seulement 5 % à 10 % de hTR se trouve dans les CB (72). Ceci a encore été confirmé par une technique de FISH très sensible combinée à de la microscopie à super-résolution (72).

Malgré la présence de hTR aux CB, leur rôle dans la maturation ou le recrutement de la télomérase est encore peu compris et n'est pas essentiel au fonctionnement de la télomérase. En effet, il a été observé que les CB facilitent le recrutement de la télomérase dans les télomères (79,81). De plus, de précédentes études ont montré que les CB étaient adjacents aux foci de hTR associés aux télomères mais pas avec les foci de hTR non-associés aux télomères, suggérant un transport de hTR aux télomères par les CB (81,84). Cependant, l'imagerie en cellules vivantes a montré que le recrutement de hTR aux télomères ne se passait pas exclusivement aux CB et que la délétion de hTERT diminuait la fraction de hTR retrouvés aux CB (72). De plus, la déplétion de la protéine de structure des CB (*coilin*) n'affecte pas la localisation de hTR aux télomères, soutenant le rôle non essentiel des CB dans le recrutement de hTR aux télomères (85). Finalement, la déplétion de TCAB1 empêche la localisation de hTR aux CB sans affecter les niveaux de hTR ou l'assemblage de la télomérase (41,50,68).

c. Assemblage de la télomérase

Puisque l'ARN hTR contient la matrice nécessaire pour synthétiser l'ADN télomérique par transcription inverse et que la protéine hTERT possède une activité rétro-transcriptase, l'interaction entre des deux facteurs est nécessaire pour l'activité de la télomérase (71). Cependant, le mécanisme et la localisation de l'assemblage entre ces deux composants n'est pas encore été défini et nécessite une étude plus approfondie. Initialement, il a été proposé que l'assemblage de la télomérase se passait au début de la phase S dans le nucléole (86). Cependant, d'autres études ont rapporté que hTR et hTERT sont localisés dans différents compartiments du noyau (84), ou bien que hTERT se trouve dans le nucléole au début de la phase S lorsqu'il est exprimé dans des cellules primaires mais exclu du nucléole tout au long du cycle cellulaire dans des lignées cellulaires tumorales et immortalisées (87). Un autre modèle suggère que hTR est assemblé avec hTERT dans les CB (72,84). Cependant, les observations selon lesquelles la déplétion de TCAB1 n'affecte pas l'assemblage de la télomérase implique qu'une voie d'assemblage de la télomérase indépendante des CB devrait exister (41,50).

IV. Recrutement de la télomérase aux télomères

a. Les principaux « protagonistes »

i. TPP1 et POT1 du complexe de la shelterin

La protéine TPP1 est composée de trois domaines, soit *OB-fold*, central et C-terminal. Le domaine *OB-fold* (aussi nommé *TEL patch*) lie l'ADN simple brin à l'extrémité chromosomique. De plus, ce domaine participe aux interactions protéine-protéines et est essentiel au recrutement de la télomérase via son interaction directe avec le domaine TEN et le motif TRAP du domaine RT de hTERT (4,46) (Figure 8). Le domaine central permet quant à lui la liaison à POT1, alors que le domaine C-terminal est essentiel à son association avec la protéine TIN2, ce qui permet l'intégration de TPP1 et de POT1 au complexe *shelterin* (14,88,89) (Figure 8). TPP1 est la clé nécessaire au recrutement de la télomérase aux télomères (90). En effet, une déplétion de TPP1 résulte en une réduction du recrutement de la télomérase (91). De plus, il a été montré que certains acides aminés de TPP1, à savoir E169, E171 et L212, jouaient un rôle essentiel dans le recrutement de la télomérase (92). Qui plus est, des expériences de *fluorescence in situ hybridization* (FISH)

sur hTR ont révélées que le domaine *TEL patch* de TPP1 était impliqué dans la localisation de la télomérase aux télomères (92).

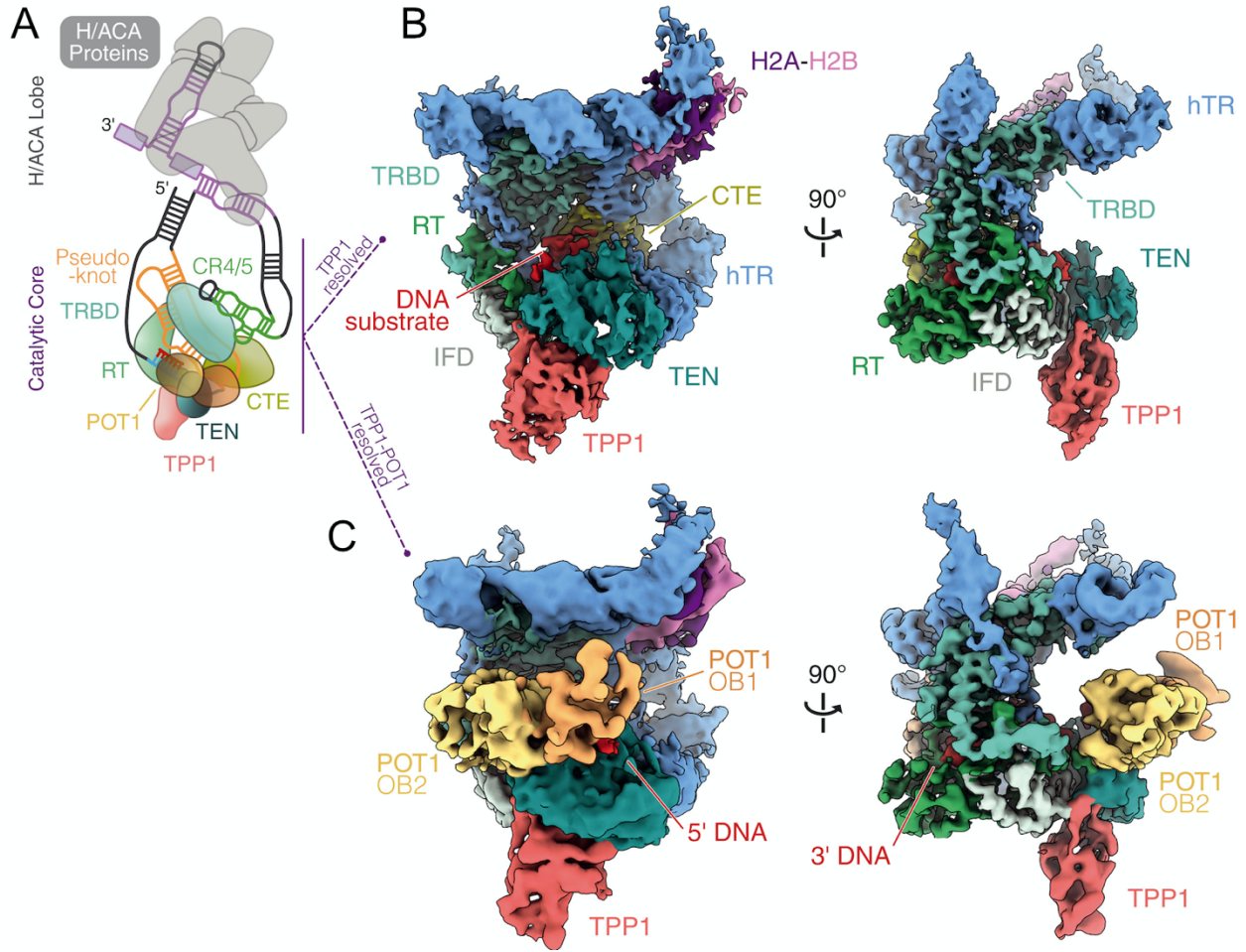


Figure 8: Structure du noyau catalytique de la télomérase. Une reconstruction cryo-EM de 3,2 Å du complexe télomérase-noyau catalytique-ADN-TPP1. Une reconstruction cryo-EM 3,9 Å du complexe télomérase catalytique core-ADN-TPP1-POT1. Figure adaptée de Ghanim et al., 2021 (93).

La protéine POT1 possède quatre domaines, soient trois domaines *OB-fold* (OB1, OB2 et OB3) et un *Holliday junction resolvase domain* (HJRD) (94). Le domaine *OB-fold* du côté C-terminal (OB3) lie TPP1 tandis que les deux domaines *OB-fold* du côté N-terminal (OB1 et OB2) lient la région d'ADN simple brin sur le télomère avec une grande affinité (94–97) (Figure 2, 8). POT1 permet d'inhiber l'extension télomérique en séquestrant la protrusion 3', permettant ainsi de prévenir le recrutement de la télomérase sur les télomères (Figure 1, 2) (94). En effet, un mutant

de POT1 auquel il manque un des deux domaines *OB-fold* en N-terminal (POT1- Δ OB) a été exprimé dans des cellules cancéreuses humaine et montre un allongement des télomères (98). Ceci suggère qu'il existerait une compétition entre POT1 et la télomérase pour la liaison à la protrusion 3' du télomère. Cependant, dans les cellules en division constante (e.g. cellules souches), la télomérase est active ce qui suggère l'existence d'un mécanisme qui permettrait de lever l'interaction de POT1 à la protrusion 3' simple brin pour permettre l'accès de la télomérase à son site d'activité. De plus, plusieurs mutations de POT1 se trouvent généralement dans les domaines *OB-fold* et sont associées à différents cancers (Figure 9) (99). Parmi ces mutants, il y a les mutations ponctuelles K90E et Y223C retrouvées respectivement dans les domaines OB1 et OB2 qui ont été identifiées chez des patients ayant une leucémie lymphoïde chronique (100), il y a aussi le mutant D224N retrouvé dans le domaine OB2 et qui a été identifié chez des patients atteints de mélanome cutané malin (*cutaneous malignant melanoma*) (101).

La découverte de variants de POT1 associés à des télomères longs et à une prédisposition accrue au cancer a fourni une raison pour revoir la relation entre la longueur des télomères et le développement du cancer. En effet, il est dit que raccourcissement des télomères est lié à des maladies dégénératives et à un risque accru de cancer (102–104). Cependant, au cours de la dernière décennie, il y a de plus en plus de preuves montrant que les télomères longs causés par des mutations dans les composants de la *shelterin* (POT1, TPP1 et RAP1) présentent également un risque accru de cancer (99,105–111). Parmi elles, les mutations POT1 sont les plus fréquentes et ont été rapportées dans un large éventail de types de cancer (Figure 9) (112). Les domaines *OB-fold* sont des domaines fonctionnels importants qui médient diverses interactions protéine-ADN, protéine-ARN et protéine-protéine (113). Parmi les mutants identifiés, POT1 K90E a été rapporté comme ayant la même affinité de liaison à l'ADN simple brin que le POT1 WT (114). Pourtant, une augmentation de la taille des télomères est observée dans les cellules exprimant ce mutant ainsi qu'une augmentation d'une fragilité télomérique, ce qui indique des défauts dans la réplication des télomères (112). Les patients qui présentent de telles mutations ont aussi en général des télomères plus longs. bien que POT1 lie toujours le brin 3' simple brin dans certains cas (112), ce qui suggère l'implication du domaine *OB-fold* dans le mécanisme qui permet à la télomérase d'accéder aux télomères en présence de POT1.

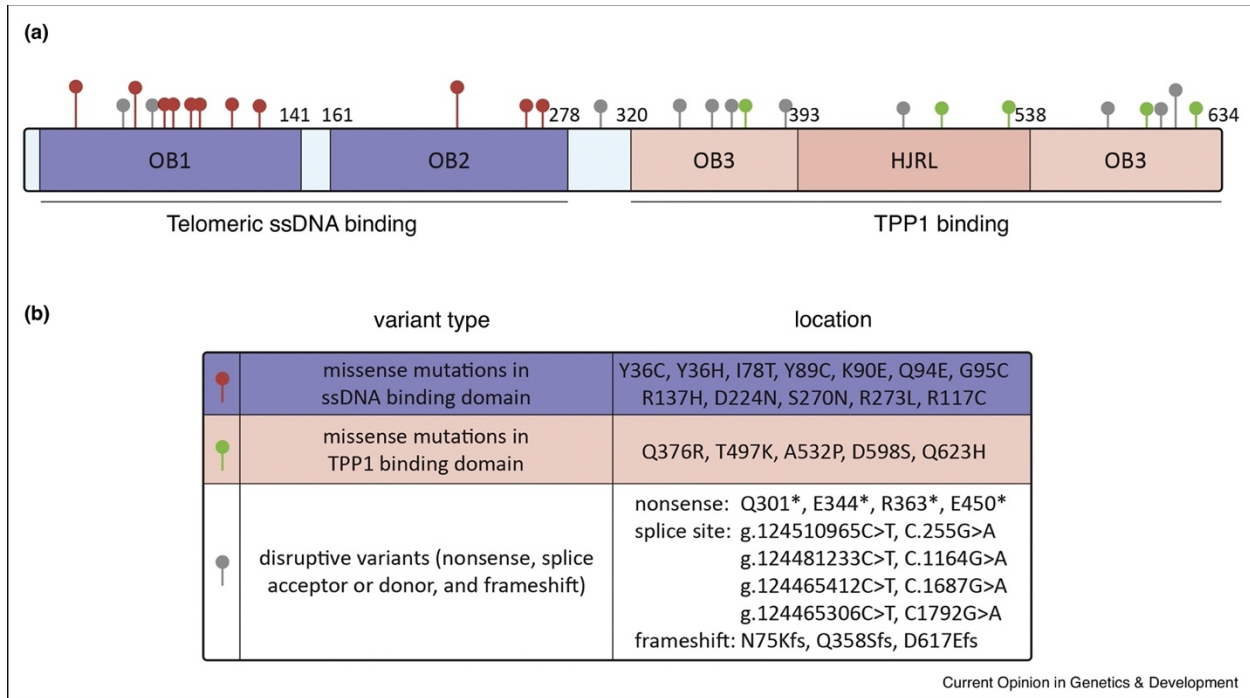


Figure 9: Variants germinaux rares dans POT1 identifiés dans les cancers familiaux. (a) Structure schématique de la protéine POT1 humaine et des domaines conservés. Les domaines OB1 et OB2 de POT1 qui se lient à l'ADN télomérique simple brin sont colorés en mauve. Les domaines OB3 et HJRL qui permettent la liaison à TPP1 sont colorés en rose. Les positions des mutants identifiés dans les cancers familiaux sont indiquées sous forme d'épingles sur le dessus de la protéine. Les épingles les plus hautes représentent les mutations qui ont été identifiées plus d'une fois. **(b)** Tableau des mutations délétères dans les lignées germinales identifiées dans le gène POT1. Figure prise de Gong *et al.* 2020 (112).

Malgré les rôles antagonistes de POT1 et de TPP1 qui, respectivement, réprime et favorise le recrutement de la télomérase, le complexe POT1-TPP1 facilite l'extension télomérique en recrutant la télomérase aux télomères et en augmente sa processivité (92,93,115,116). Ce duo agirait donc comme un interrupteur qui inhibe ou promeut l'activité de la télomérase aux télomères selon le contexte cellulaire (94).

ii. Domaines TEN et motif TRAP de hTERT

Le domaine TEN de la protéine hTERT est crucial pour le recrutement de la télomérase aux télomères (5). En effet, il a été démontré que plusieurs mutations dans ce domaine impliquaient

une réduction du recrutement de la télomérase et une accumulation de hTR aux Cajal bodies, suggérant ainsi une interaction importante entre hTERT et TPP1 via le domaine TEN qui permettrait le maintien des télomères (48). Des expériences ont montré que le défaut de liaison aux télomères d'un mutant K78E de hTERT pouvait être compensé par l'expression d'un mutant E215K de TPP1 en permettant le rétablissement d'une interaction électrostatique entre ces deux résidus (48). En effet, ces résultats ont montré une colocalisation de hTERT et de TPP1 et un allongement des télomères, indiquant alors une potentielle interaction directe entre hTERT et TPP1 (48).

De récentes études de biologie structurale ont confirmé l'interaction entre hTERT et TPP1 au niveau du domaine TEN de hTERT mais aussi au niveau du motif TRAP (Figure 10) (46,47). Le motif TRAP a été découvert récemment et il a été montré qu'il contribuait à la processivité de la télomérase (47). En effet, plusieurs mutations connues de TEN (*e.g.* Q168A, F178A, L14A) qui ont un effet sur l'activité et la processivité de la télomérase se retrouvent à l'interface TEN-TRAP (47,117–120). Aussi, une mutation V791A du motif TRAP qui se retrouve à l'interface de TEN-TRAP a été introduite et il a été montré qu'il y avait un effet sur l'activité, le maintien de la longueur des télomères et l'immortalisation cellulaire (121). Aussi, des mutations de hTERT associées à la dyskératose congénitale ou à l'anémie aplasique (R774L et Y772C respectivement) qui résultent en la perturbation de l'interaction hTERT-TPP1 agiraient soit en déstabilisant l'interface TEN-TRAP, soit en modifiant la structure de TEN ou de TRAP (46). Tout ceci suggérerait que TRAP, en formant un complexe avec TEN, stabiliserait l'interaction hTERT-TPP1 et contribuerait à l'activité de la télomérase (47). Un test d'activité directe de la télomérase a révélé qu'une substitution par une alanine sur quelques résidus de l'interface TEN-TRAP entraînerait une diminution de la stimulation de l'activité de la télomérase (46). En présence de TPP1, il y aurait une augmentation de l'activité sans avoir aucune incidence sur la processivité (46). Cependant, en présence du duo TPP1-POT1, le même phénotype est observé quant à l'activité de la télomérase mais la processivité est augmentée d'environ 1.4 fois (46). Ainsi, le duo POT1-TPP1 influencerait positivement la processivité de la télomérase (46,93).

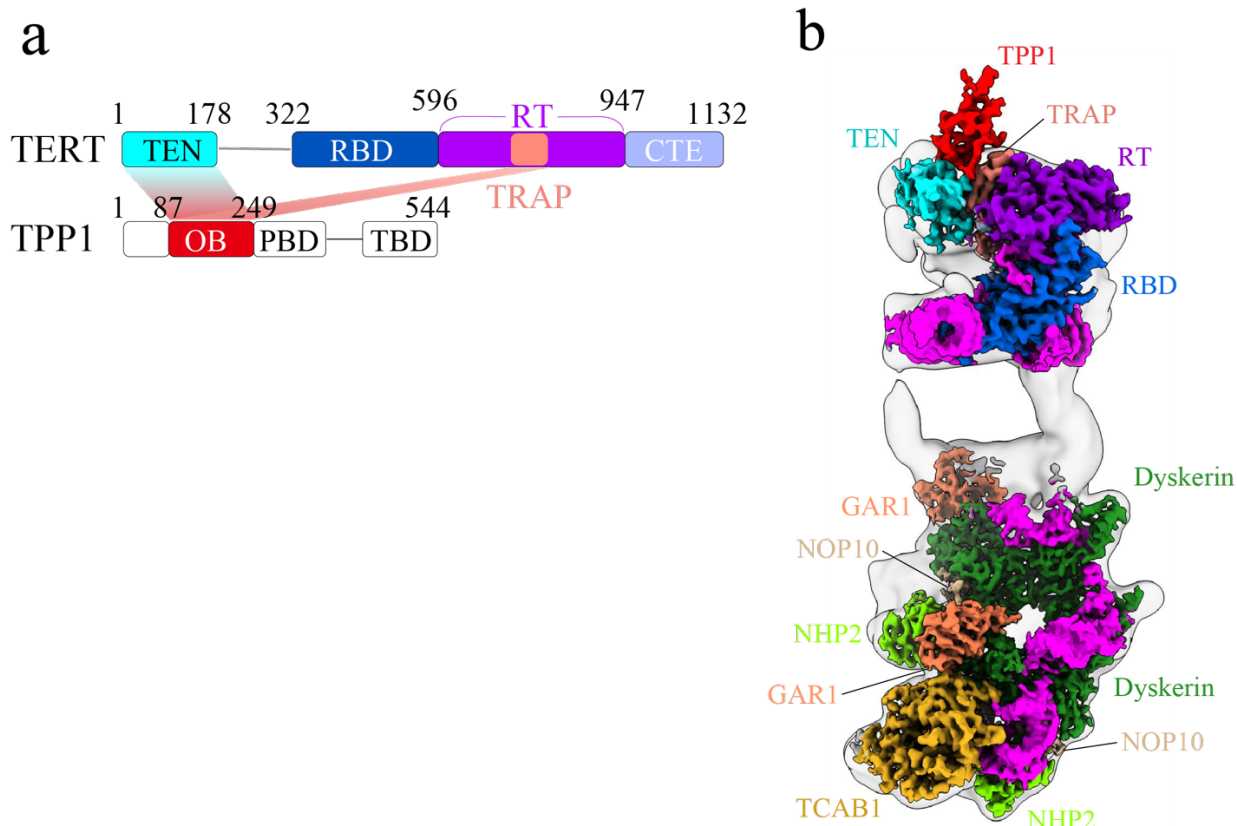


Figure 10: Structure de la télomérase humaine avec TPP1. a) Schéma des domaines et interactions de hTERT et TPP1. PBD : domaine de liaison POT1 ; TBD : domaine de liaison TIN2. b) La carte cryo-EM à résolution 3,5 Å de l'ensemble de la télomérase du noyau catalytique liée à TPP1.

b. Régulation du recrutement de la télomérase aux télomères

i. Promotion du recrutement de la télomérase aux télomères

Le recrutement de la télomérase sur les télomères se fait notamment par l'intermédiaire de la liaison du domaine TEN et du motif TRAP de hTERT à TPP1 (46,47,90). Cependant d'autres facteurs semblent être impliqués dans le recrutement, comme la protéine TIN2. En effet, il a été montré que des cellules qui exprimaient des mutants TIN2, tels que TIN2-R282H, R282C ou encore K280E, présentaient des télomères courts malgré le recrutement de TPP1 (122,123). De plus, la surexpression de TIN2 induit une augmentation de la processivité de la télomérase (124).

D'autres facteurs qui semblent être impliqués sont les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*). Il s'agit de protéines qui sont recrutées et qui s'activent lors des bris doubles brins d'ADN, provoquant ainsi un arrêt du cycle cellulaire (125–127). Lorsque ATM est inhibée, des problèmes au niveau du recrutement de la télomérase et au niveau de la maintenance des télomères sont observés, suggérant ainsi que ATM promeut l'élongation des télomères et par conséquent le recrutement de la télomérase (128,129). Tandis que les substrats spécifiques de ATM qui affectent la longueur des télomères dans les cellules mammifères ne sont pas entièrement connus, il a été montré que cette kinase phosphorylait TRF1, protéine qui médie l'élongation des télomères (130). Aussi, une étude a montré que ATM régule l'accès de la télomérase aux télomères et le groupe a trouvé que TRF1 jouait un rôle dans ce processus, suggérant que ATM ciblerait TRF1 pour favoriser le recrutement de la télomérase aux télomères (129). Récemment une autre étude a montré que ATM facilite l'interaction de la télomérase aux télomères et qu'ATR a le même effet mais dans une moindre mesure (72). Par contre, aucun effet sur le temps de résidence de la télomérase aux télomères n'a été observé lorsque ces kinases sont inhibées, ce qui a amené à proposer que leur activité faciliterait l'accès de hTERT à TPP1 (72). Que ce soit ATM ou ATR, ces deux kinases sont connues pour jouer un rôle dans le recrutement de la télomérase aux télomères et par conséquent dans l'élongation des télomères (128,129).

Un autre facteur impliqué dans le recrutement de la télomérase aux télomères est la protéine hélicase RTEL1 (*Regulator of Telomere Elongation Helicase 1*) (131). En effet, TRF2 permet de recruter cette hélicase aux télomères au niveau de la *D-loop*, permettant ainsi de perturber cette *D-loop* et défaire la *T-loop*, libérant ainsi la protrusion 3' et laissant libre accès à la télomérase (132,133). Des expériences de déplétion de RTEL1 ont révélé un raccourcissement des télomères dans des cellules qui présentaient de longs télomères, appuyant ainsi le fait que RTEL1 faciliterait l'activité de la télomérase aux télomères (131).

ii. Répression du recrutement de la télomérase aux télomères

En plus de jouer un rôle dans le recrutement de la télomérase aux télomères, le complexe *shelterin* peut aussi jouer un rôle dans sa répression (134). En effet, il a été montré que des protéines de ce complexe étaient des régulateurs négatifs de la télomérase, à savoir TRF1 et TRF2

(135). Lorsque ces protéines sont surexprimées dans des cellules cancéreuses, un raccourcissement des télomères est observé, suggérant ainsi leur potentiel rôle dans la répression de la télomérase (135). Il a été suggéré que TRF2 participe à la formation de la *T-loop* et cette structure empêcherait le recrutement de la télomérase à la protrusion 3' des télomères (136). De plus, le nombre de copies de TRF1 et TRF2 sur un télomère est proportionnel à sa longueur, impliquant ainsi qu'un télomère court présente moins de protéines et est supposément plus enclin à recruter la télomérase (135,137). RAP1, une autre protéine du complexe *shelterin* qui est recrutée par TRF2 est aussi considéré comme un répresseur du recrutement de la télomérase mais sans pour autant que son mécanisme d'action soit clair (138). Il a été suggéré que RAP1 liait un régulateur positif de la télomérase pour le réprimer, ce qui engendrait une diminution du recrutement de la télomérase (138).

Le complexe CST est aussi connu pour participer à la maintenance des télomères (139). Des expériences de *knockdown* des protéines qui composent le complexe CST, à savoir Ctc1, hStn1 et hTen1 ont révélé une augmentation de la taille des télomères, suggérant ainsi qu'il s'agit d'un régulateur négatif du recrutement de la télomérase (140). Il s'agit aussi d'un complexe qui joue un rôle dans la réplication des télomères (4). En effet, le complexe CST assiste la réplication de l'ADN aux télomères en interagissant avec l'ADN primase et en la stimulant (141). De plus, ce complexe inhibe l'extension télomérique en limitant l'accès de la télomérase aux télomères et en inhibant l'interaction entre TPP1-POT1 et la télomérase, ce qui permettrait de terminer la réplication des télomères (140).

V. Imagerie de molécules uniques en cellules vivantes

a. Imagerie des cellules vivantes en temps réel

La télomérase étant au cœur de la formation de la majorité des cancers, il est essentiel d'étudier sa régulation pour identifier de potentielles nouvelles cibles de traitement. De récentes études ont montré que le recrutement de la télomérase aux télomères est un processus dynamique (142,143), soulignant l'importance de l'étude de ce mécanisme par des méthodes de microscopie de molécules uniques en temps réel. En effet, ces techniques permettent le suivi des protéines individuelles dans les cellules vivantes fournissant ainsi de l'information essentielle pour

comprendre comment elles médient leur fonction. De telles informations peuvent être obtenues à partir de techniques d'imagerie en molécule unique, tels que le suivi de particules uniques (SPT) ou encore la microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM). Ainsi, l'imagerie de molécules uniques en temps réel permet de capturer la dynamique de processus biologiques qui ne peuvent être capturés avec les méthodes de biochimie classiques.

b. Le système MS2 pour marquer l'ARN hTR

Pour étudier la dynamique de la télomérase en cellules vivantes, notre laboratoire a adapté le système MS2 pour le suivi de l'ARN hTR dans des cellules de cancer humaines (144). Le système MS2 est basé sur le bactériophage MS2 dont l'ARN possède une structure en tige-boucle, sur lequel une protéine du phage (*MS2 bacteriophage coat protein* ou MCP) se lie de façon spécifique et à haute affinité (145). Ainsi, plusieurs copies de la tige-boucle MS2 peuvent être insérées à notre ARN d'intérêt (hTR) et ces tiges-boucles seront reconnues uniquement par la protéine MCP fusionnée à une protéine fluorescent (superfolder GFP ou sfGFP), permettant ainsi de suivre l'ARN marqué par microscopie en cellules vivantes (145). Trois tiges-boucles MS2 ont été insérées dans la partie 5' de l'ARN hTR, sur lesquels six protéines de fusions MCP-sfGFP se lient pour octroyer la fluorescence (Figure 11) (144). L'insertion de ces 3 tiges-boucles MS2 et la présence des protéines MCP-sfGFP sur hTR n'affectent ni son expression, ni sa maturation et ni l'activité de la télomérase *in vivo* (72).

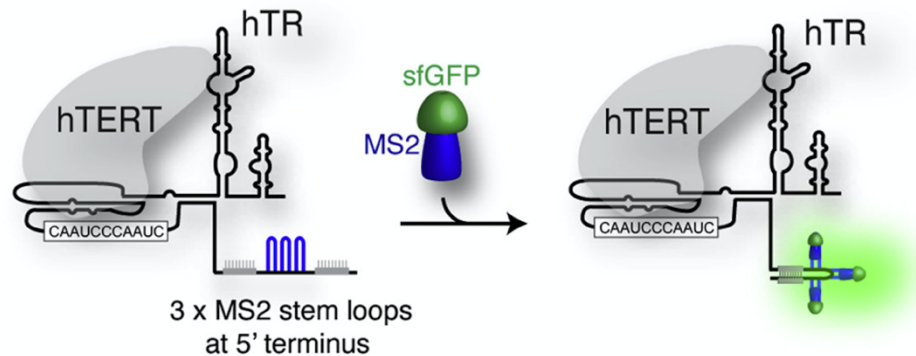


Figure 11: L'ARN hTR marqué avec des tiges-boucles MS2 à son extrémité 5'. A l'extrémité 5', trois tiges-boucles MS2 ont été insérées (en bleu), sur lesquelles la protéine MS2 coat protein

couplé à une sfGFP se lie (MS2 –sfGFP) pour marquer cet ARN. Reproduite de Laprade et al. (72).

c. L'étiquette HaloTag® pour marquer les protéines

En raison de la complexité inhérente liée aux processus cellulaires, de multiples méthodes analytiques sont généralement nécessaires pour élucider clairement les mécanismes sous-jacents. Un bon nombre de ces méthodes reposent sur la capacité de marquer spécifiquement les protéines par la création de protéines de fusion, conférant ainsi des propriétés uniques pour la visualisation, la capture et la manipulation sélectives des protéines dans des environnements biochimiquement complexes. Plusieurs protéines fluorescentes, telles que la GFP, sont utilisées pour construire ces protéines qui permettent d'étudier le comportement, la localisation ou encore les interactions des protéines dans les cellules vivantes (146,147). D'autres étiquettes de fusion, telles que His tag et FLAG tag, permettent quant à elle la capture et la purification des protéines (148,149). Cependant, ces étiquettes sont généralement limitées dans leur fonction et la construction de plusieurs clones est nécessaire afin de réaliser l'ensemble des expériences nécessaire à caractériser le rôle d'une protéine. L'utilisation d'une seule étiquette, qui pourrait être facilement reconfigurée pour répondre aux besoins de différentes tâches expérimentales, permet de pallier à cette limitation (150). C'est là où intervient la technologie HaloTag®, une étiquette de fusion à laquelle peuvent s'associer de manière covalente de nombreux ligands interchangeables (150) (Figure 12). HaloTag est une protéine de 297 acides aminés (33 kDa) dérivée de l'enzyme haloalcane déshalogénase bactérienne *Rhodococcus*, conçu pour se lier de manière covalente à un ligand synthétique (150). En effet, la mutation H272F qui a été introduite dans l'enzyme permet d'établir une liaison stable avec des molécules synthétiques ajoutées à un liant chloroalcane. Le ligand synthétique est choisi parmi un certain nombre de ligands disponibles en fonction du type d'expériences à effectuer (*e.g.* imagerie ou purification) permettant l'utilisation d'un seul construit pour l'ensemble des expériences nécessitant l'utilisation d'une étiquette (150). Pour l'imagerie en temps réel, plusieurs ligands Janelia Fluor® sont disponibles, dont : Janelia Fluor® 549 et Janelia Fluor® 646.

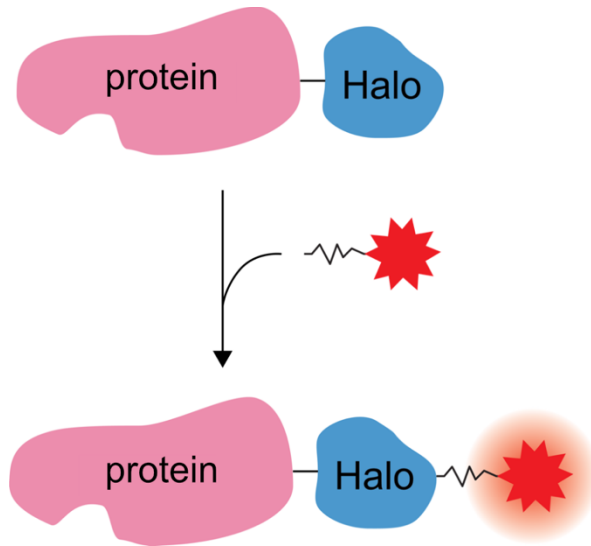


Figure 12: L'étiquette HaloTag, un puissant outil pour marquer les protéines d'intérêt. L'étiquette HaloTag est fusionnée à une protéine d'intérêt puis un ligand, ici fluorescent, (rouge) qui se lie de manière covalente à cette étiquette est ajouté.

d. Étude de la télomérase par imagerie en molécules uniques

L'étude de la télomérase par imagerie en molécules uniques n'a fait l'objet que de peu d'études. En effet, les premières visualisations de la télomérase ont été faites dans le noyau de la levure *S. cerevisiae* grâce au système MS2 qui marquait l'ARN *TLC1* (homologue de hTR), ce qui a révélé une différente dynamique de la télomérase dépendamment du cycle cellulaire (142). Récemment, et avec cette approche, notre laboratoire a pu détecter des molécules uniques de hTR et a montré que la télomérase peut scanner les télomères via une interaction hTERT-TPP1 durant quelques secondes (72). Ces interactions courtes peuvent être suivies d'interactions plus longues, de l'ordre de quelques minutes, où la télomérase est retenue au télomère via l'appariement entre hTR et la protrusion 3' du télomère simple brin (72). En effet, grâce à l'utilisation de mutants et d'inhibiteurs de régulateurs de la télomérase, un nouveau modèle a été établi, montrant qu'il y aurait une étape de scan des télomères par la télomérase suivi d'une possible rétention de hTR sur les télomères essentielle à leur élongation (Figure 13) (72).

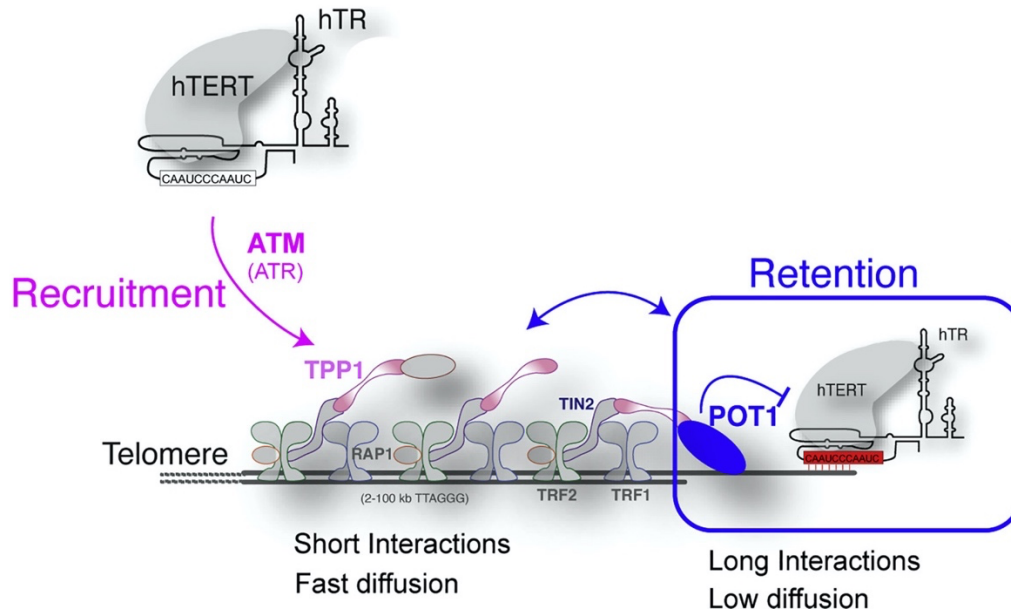


Figure 13: Modèle de la dynamique de hTR aux télomères. L'allongement des télomères est régi par un modèle de « recrutement-rétention ». Le recrutement de la télomérase aux télomères est médié par l'interaction entre hTERT et TPP1 et facilité par le ATM et, dans une moindre mesure, par ATR. Ceci permet une série d'interactions courtes dans lesquelles la télomérase est plus diffusive que son substrat. Une fraction de ces particules de télomérase est retenue aux extrémités chromosomiques lors de l'appariement de base de la région gabarit de hTR avec le surplomb du télomère (72). Figure adaptée de Laprade *et al.* (72).

Aussi, un marquage de hTERT avec le système HaloTag a permis d'observer en temps réel des particules uniques de télomérase dans des cellules vivantes par microscopie à fluorescence (143). Cette étude a révélé que la télomérase diffuse de manière tridimensionnelle pour rechercher des télomères, sondant chaque télomère plusieurs fois pendant la phase S, mais ne formant que rarement une association stable (143). Aussi, il a été montré qu'il y a des événements d'association transitoires et stables qui dépendent de l'interaction directe entre hTERT et TPP1 (143). En utilisant un inhibiteur compétitif à la télomérase, il a été montré que la stabilité de l'association de la télomérase à la protrusion 3' du télomère simple brin nécessite un appariement télomérase-base de l'ADN, suggérant ainsi que cette interaction implique un allongement des télomères (151). Ainsi, la télomérase forme des interactions courtes, dynamiques et longues et statiques avec les télomères (143,151). La question de savoir si la télomérase est recrutée dans des télomères spécifiques (*e.g.*

des télomères courts) au cours d'une période donnée (*e.g.* phase du cycle cellulaire) reste par contre en suspens.

e. Analyse des données d'imagerie moléculaire

Les avancées d'équipements de microscopie ainsi que des techniques de marquage permettent aux chercheurs d'imager une variété de molécules biologiques dans presque toutes les cellules, tissus ou organismes (144–150). Cependant, l'analyse des images produites par ces techniques peut rester difficile (*e.g.* lorsqu'il n'existe pas de méthode éprouvée pour l'analyse) en raison de la grande diversité dans les images et les analyses qui en sont faites. En effet, la majorité des outils existants sont ainsi hautement spécifiques pour une tâche particulière et il n'existe aucun outil universel capable d'analyser l'ensemble des images de microscopie (152). De plus, même la combinaison de logiciels déjà existants nécessite une maîtrise de la programmation, une expérience de la microscopie quantitative, ainsi qu'un confort avec les mathématiques et les statistiques complexifiant rapidement l'analyse (153).

Plusieurs outils existent cependant pour analyser les images de microscopie en fluorescence en image fixe qui peuvent être mis à profit pour construire un pipeline d'analyse adapté aux données. Certains outils permettent le suivi de particules uniques, permettant ainsi de capturer la dynamique des particules imagées (152,154). D'autres permettent d'effectuer l'analyse des événements de colocalisation, souvent par l'évaluation qualitative des pixels qui se chevauchent ou par d'autres solutions basées sur une analyse statistique globale des distributions d'intensité des pixels (153,155,156). Deux des applications les plus utilisées pour l'analyse de colocalisation sont JACoP et EzColocalization, deux plugins FIJI (153,157). JACoP est un plugin qui peut générer des nuages de points d'intensité de pixel pour visualiser les modèles de localisation et mesurer la colocalisation (157). Il permet également de choisir les différents seuils manuellement ou automatiquement (157). Malheureusement, JACoP n'a pas d'options intégrées pour automatiser les analyses ou effectuer des mesures de colocalisation pour plusieurs objets d'une image. Par conséquent, les analyses peuvent être difficiles pour les images avec différentes cellules à quantifier. EzColocalization quant à lui est un plugin ayant une interface graphique qui permet de visualiser et mesurer les colocalisations (153). Il dispose également d'outils pour la saisie d'images, l'identification des cellules, la visualisation des schémas de localisation, la mesure de la colocalisation, ainsi que l'affichage et la sauvegarde des résultats (153). EzColocalization est un

plugin FIJI avec une interface graphique, des outils pour l'analyse du début à la fin de la colocalisation et de nombreuses options pour personnaliser les analyses (153). Les outils sont fournis pour sélectionner des types spécifiques de cellules ou d'organismes, pour visualiser et mesurer la colocalisation et aussi pour automatiser les analyses (153). L'analyse génère un tableau de données avec des mesures de la colocalisation, de l'intensité du signal et des paramètres physiques pour chaque cellule (153).

Cependant, ces outils, ainsi que la majorité des outils développés déjà existant pour analyser la colocalisation de particules, ne supportent pas l'imagerie en temps réel mais uniquement des images statiques (153,157–159). Certes, un film est un ensemble de plusieurs images fixes mais la composante temporelle dans les films est un paramètre important dans l'étude de la dynamique d'un mécanisme. Par conséquent, il y a un besoin urgent d'un seul programme qui fournit tous les outils nécessaires à l'analyse du début à la fin de la colocalisation et qui peut être facilement personnalisée. Dans ce projet, un programme appelé DCTracker a été développé afin que les chercheurs de tous les niveaux de compétence puissent mesurer la colocalisation de deux particules (ou compartiments) ou plus.

VI. Problématique et hypothèse

Bien qu'il soit proposé que l'assemblage des sous-unités hTERT et hTR s'effectuerait aux CB, il n'y a pas de consensus sur l'enchaînement des étapes qui conduisent à cet assemblage. De plus, une fois la télomérase assemblée, son accès aux télomères est contrôlé, notamment par la protéine POT1. Des mutations de POT1, tel que K90E, sont observées chez des patients atteints de cancer, mais l'impact de telles mutations sur l'accès de la télomérase aux télomères reste inconnu. *Deux hypothèses ont donc été posées* : 1) Une étape dans la maturation de la télomérase est favorisée au niveau du nucléole par la liaison de hTR à TCAB1, qui permettrait son trafic vers les CB. 2) Certaines mutations dans POT1, tel que K90E, augmenterait le recrutement de la télomérase aux télomères.

VII. Objectifs et approche expérimentales

Objectif 1 – Développer un programme d’analyse d’images pour évaluer la colocalisation de particules de manière automatique.

Description : La façon la plus puissante d’évaluer le recrutement de la télomérase aux télomères est d’utiliser de la microscopie en temps réel en *Dual camera* sur cellules vivantes pour visualiser de manière simultanée les foci de mCherry-TRF1 et les particules de MCP-sfGFP liée à hTR. Cependant, n’étant pas une méthode couramment utilisée, l’analyse manuelle des films est complexe, longue et laborieuse. De plus, aucun outil existant ne permettait d’analyser ce type de films, la plupart étant développés pour évaluer la colocalisation sur images statiques ou l’analyse de particules dynamique sans prendre en compte la colocalisation.

Méthodologie : Afin de pallier ces limitations, nous avons développé un programme qui permet d’analyser de manière automatique un grand nombre de données concernant la colocalisation de particules : DCTracker. Un pipeline d’analyse a ainsi été développé pour effectuer un pré-traitement des images dans Fiji puis une analyse des données est effectuée à partir d’un script Python 3. Le pipeline tire profit de la puissance de l’outil TrackMate (152) pour effectuer le suivi des particules dans les films. Ces informations sont ensuite utilisées dans le script DCTracker qui met en relation l’ensemble des particules d’une cellule pour déterminer celles qui respectent les paramètres de colocalisation établies précédemment (72). L’efficacité du programme a été validée en utilisant des données publiées par Laprade et *al.* (72).

Objectif 2 – Déterminer le rôle de POT1 et l’effet de mutations pro-oncogéniques dans POT1 sur l’interaction entre la télomérase et les télomères.

Description : Étant donné que la présence de la mutation K90E de POT1 est liée à une élongation anormale des télomères même si ce mutant lie toujours l’ADN télomérique, ce mutant sera utile pour étudier le rôle de POT1 dans la régulation du recrutement de la télomérase. De plus, comme cette mutation se trouve dans le premier domaine *OB-fold* de POT1 et que nos travaux ont montré que la délétion du premier domaine *OB-fold* de POT1 augmente le recrutement de la télomérase aux télomères (72), il est intéressant de voir si le même phénotype est observé avec le mutant K90E de POT1.

Méthodologie : Le cDNA de POT1 possédant la mutation ponctuelle K90E a été cloné dans un vecteur d’expression lentiviral puis exprimé dans des cellules HeLa. Des expériences

d'immunofluorescence et d'immunobuvardage de type Western ont été faites afin de s'assurer du niveau d'expression de POT1 K90E. Suite à cela, des expériences de microscopie en temps réel en *Dual-camera* sur cellules vivantes avec un microscope confocal à disque rotatif ont été faites pour mesurer la dynamique de la télomérase (marquée par MCP-sfGFP sur hTR-MS2) vis-à-vis des télomères (marqués par mCherry-TRF1) en présence de POT1 K90E versus POT1 sauvage. Nous avons mesuré l'impact de POT1 K90E sur les interactions courtes (en secondes) ou longues (en minutes) entre hTR et les télomères, ainsi que sur la proportion de télomères associés à hTR.

Objectif 3 – Déterminer si la protéine TCAB1 est associée avec hTR dans le nucléole et aux CB.

Description : La protéine TCAB1 permettrait de cibler l'ARN de la télomérase aux Cajal bodies (CB), un compartiment nucléaire où on retrouve la maturation de divers petits ARN (41). De plus, des particules de hTR ont aussi été retrouvées dans le nucléole, supportant une potentielle étape de maturation dans ce compartiment (72). Aussi, la biogénèse de la télomérase nécessite une coordination spatio-temporelle entre ses composantes qui n'est pas tout à fait définie. Il serait donc pertinent de voir si TCAB1 se retrouverai au niveau du nucléole, associée avec hTR, et permettrait de cibler cet ARN aux Cajal Bodies.

Méthodologie : La protéine TCAB1 a été fusionnée à un HaloTag par clonage dans un vecteur lentiviral puis exprimée dans des cellules cancéreuses exprimant hTR-MS2 et un marqueur des télomères (mCherry-TRF1). Des expériences d'immunobuvardage de type Western ont été faites afin de s'assurer du niveau d'expression de Halo-TCAB1 pour qu'il soit similaire à TCAB1 endogène. Par la suite, Halo-TCAB1 sera marqué par Janelia Fluor 646, hTR sera marqué avec la sfGFP, et le nucléole et les CB seront marqués indépendamment avec les protéines *nucleolin* et *coilin*, respectivement, fusionnées à la protéine BFP. De l'imagerie sur un microscope à haute résolution par la méthode HiLo (*highly inclined and laminated optical sheet*) sera faite pour détecter les molécules uniques de TCAB1, et évaluer leur colocalisation dans le nucléole et aux CB.

Chapitre 2 – Matériel et Méthode

Réactifs et ressources

Tableau 1 : Réactifs et matériel utilisés

Réactifs	Source	Identification
Anticorps		
Anti-c-MYC antibody (9E10)	Roche	Cat. No. 11667149001
Anti β -tubulin		
Anti-Telomerase reverse transcriptase antibody (Y182)	Abcam	Cat#ab32020
Anti-Lamine A-C (mab636)	Thermo Fisher	Cat#MA3-1000
Anti-WDR79 (TCAB1)	Novus Biologicals	Cat#NB100-68252
Anti-WRAP53 (TCAB1)	ProteinTech	Cat#14761-1-AP
Anti-coilin, monoclonal mAb	Sigma	Cat#C1862
Alexa Fluor488 anti-Rabbit	Jackson Immunoresearch	711-545-152
Alexa Fluor594 anti-Mouse	Jackson Immunoresearch	715-585-150
Fluorophores		
JF646 HaloTag Ligand	Promega	GA1120
JF549 HaloTag Ligand	Promega	GA1110
Lignées cellulaires		
293T	ATCC	CRL-3216
HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2	Laprade et al. 2020	-
HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1 ^{-/-}	Laprade et al. 2020	-
Plasmides		
pHageUBC-MCP-sfGFP	Laprade et al. 2020	-
pHage2-EF1a-TagBFP-hCoilin	Laboratoire Chartrand	-
pHage2-EF1a-TagBFP-nucleolin	Laboratoire Chartrand	-
pHage2-EF1a-mCherryTRF1-IRES-Blast	Laprade et al. 2020	-
pHage2-EF1a-TERT-IRES-Puro	Laprade et al. 2020	-
pHAGE2-EF1a-MCS-IRES-puro	Laboratoire Chartrand	-
pHAGE2-EF1a-POT1-K90E-IRES-blast	Laboratoire Chartrand	-
pHAGE-EF1a-POT1-WT-IRES-puro	Laprade et al. 2020	-
pHAGE2-EF1a-POT1-deltaOB-IRES-puro	Laprade et al. 2020	-
pHAGE-EF1a-POT1-K90E-IRES-puro	Laboratoire Chartrand	-
pHAGE-EF1a-3xFLAG-hTCAB1-IRES-hygro	Laboratoire Chartrand	-
pHAGE2-EF1a-HALO-TERT-IRES-hygro	Laboratoire Chartrand	-
pHage2-EF1-HaloTCAB1-IRES-Hygro	Laboratoire Chartrand	-
pHAGE-UBC-HA-2xMCP-mCherry-2	Laboratoire Chartrand	-
pCMV-VSV-G	Addgene	8454
pCMV-deltaR8.2	Addgene	8455

pHage2-UBC-HaloTCAB1-IRES-Hygro	Laboratoire Chartrand	-
Logiciels et programmes d'analyse d'images		
FIJI Image J v1.53f51	Schneider et al., 2012	https://imagej.net
TrackMate v7.6.1	Tinevez et al., 2017	https://github.com/fiji/TrackMate
DCTracker	Laboratoire Chartrand	-
R studio v4.1.2	R	-
Zen Microscopy software version ZEN 3.0	Zeiss	-
Amorces	Séquence	
pHageSeqFor2	CGGGTTTATTACAGGGACAG	
pHageSeqRev3	TTCCGGGCCCTCACATTG	
HALOfor	TTAAGCGGCCCGCCATGGAAATCGGTACT GGCTTCCATTC	
HaloLINKERrev	TTAAGCTAGCCATCGCGGGGGTGGCCG GGGCCAG	
cloneTCAB1for	TTAAGCTAGCGGCGGAGGTGGCAGTGC CAAGACTTTGGAGACTCAACCGTTAG	
cloneTCAB1rev	TTAAGTCGACCTCGAGCTCTAGATAC	
TCAB-2010	TAGGAGCCACAGGCATAGAG	
TCAB-693	TGCAGCCAGTCCATGTATTC	
TCAB-1416	TTCCAAGCGGTGTCTCCCTC	

Clonage moléculaire

Mutants POT1

Les plasmides pHage2-EF1a-POT1-K90E-IRES-blast et pHage2-EF1a-MCS-IRES-puro ont été digérés avec les enzymes de restriction Sall-HF (NEB) et NotI-HF (NEB) puis migrés sur gel d'agarose. Les bandes d'intérêt ont été coupées et purifiées à l'aide du kit *Molecular biology kits* de BioBasics selon le protocole du fabricant. Une ligation de l'insert (POT1-K90E) et du vecteur (pHage2-EF1a-MCS-IRES-puro) à l'aide de la T4 DNA ligase a ensuite été faite selon le protocole du fabricant (NEB). Après validation du plasmide par séquençage Sanger avec les amorces pHageSeqFor2 et pHageSeqRev3 chez Génome Québec, il a été produit dans des bactéries compétentes Stbl2.

Construction Halo-TCAB1

Les plasmides pHAGE2-EF1a-HALO-TERT-IRES-hygro et pHAGE-EF1a-3xFLAG-hTCAB1-IRES-hygro ont été respectivement amplifiés par réaction de polymérisation à la chaîne (PCR) avec les amorces HALOfor/ HaloLINKERrev et cloneTCAB1for/ cloneTCAB1rev en

utilisant la FastPFU (BioBasics) pour amplifier les gènes Halo et TCAB1. Par la suite, ces deux fragments ont été digérés avec l'enzyme de restriction NheI (NEB) puis une ligation à la T4 DNA ligase a été faite selon le protocole du fabricant (NEB). Une deuxième amplification par PCR a été faite sur cette ligation à l'aide des amorces HALOfor/ cloneTCAB1rev. Une digestion par les enzymes Sall-HF et NotI-HF a été faite sur le vecteur Halo-TCAB1 nouvellement fait et le plasmide pHAGE-EF1a-3xFLAG-hTCAB1-IRES-hygro qui servira de vecteur. Une migration sur gel d'agarose a été faite puis les bandes d'intérêt ont été coupées et purifiées à l'aide du kit *Molecular biology kits* de BioBasics selon le protocole du fabricant. Une ligation de l'insert et du vecteur à l'aide de la T4 DNA ligase a ensuite été faite selon le protocole du fabricant (NEB). Après validation du plasmide par séquençage Sanger avec les amorces pHageSeqFor2, pHageSeqRev3 HALOfor, HaloLINKERrev, cloneTCAB1for, cloneTCAB1rev, TCAB-2010, TCAB-693 et TCAB-1416 chez Génome Québec, il a été produit dans des bactéries compétentes Stbl2.

Culture cellulaire et développement des lignées cellulaires

Les cellules HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 et HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1^{-/-} ont été prises du laboratoire (72). Elles ont été cultivées dans le milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Mutlicell, 319-005-CL), complété avec 10 % de sérum foetal bovin (Gibco, 12483-020), 2 mM de L-analyl-L-glutamine (glutaMAX, Gibco, 35050-061)) et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (Multicell, 450201-EL) à 37°C, 5% CO₂. Elles ont été passées toutes les 48 à 72 heures et maintenues pour un maximum de 4 semaines.

Les cellules 293T provenant de ATCC ont été utilisées pour la fabrication de lentivirus. Pour cela, environ 5 millions de cellules ont été plaqués dans un pétri. Le lendemain, 500µL de tampon jetPRIME dans lequel ont été ajouté 3µg du plasmide d'intérêt, 2µg de plasmide Δ8.9, 1µg de plasmide VSVG et 12 µL de réactif jetPRIME (#114-15 Polyplus) ont été déposés sur les cellules. Après 24h, le milieu des cellules transfectées a été changé pour du nouveau milieu. Les cellules d'intérêt à infecter ont été plaquées. 48h après la transfection, le surnagent a été récolté et filtré avec un filtre 0.45µm. Une dilution (voir Tableau II) et l'ajout de 8µg/ml final de polybrène sont fait avant de déposer sur les cellules d'intérêt à infecter. 24h après l'infection, le milieu est changé. Les cellules sont ensuite passées et mises en sélection 72h après l'infection. Pour celles ayant la résistance à la puromycine, 1µg/mL a été utilisé pendant environ 3 jours tandis que celles

ayant la résistance à l'hygromycine, 70µg/mL d'hygromycine B a été utilisé pendant environ 7 jours.

Tableau 2 : Dilution de lentivirus utilisées pour générer les lignées cellulaires.

	Dilution lentivirale
pHageUBC-MCP-sfGFP	1 :20
pHage2-EF1a-TERT-IRES-Puro	1 :2
pHAGE-EF1a-POT1-WT-IRES-puro	1 :4
pHAGE2-EF1a-POT1-deltaOB-IRES-puro	1 :4
pHAGE-EF1a-POT1-K90E-IRES-puro	1 :4
pHAGE2-EF1a-MCS-IRES-puro	1 :4
pHage2-EF1-HaloTCAB1-IRES-Hygro	1 :2.5
pHage2-UBC-HaloTCAB1-IRES-Hygro	1 :2.5

Les lignées cellulaires exprimant UBC-Halo-TCAB1 ont été marquées par 5µm de ligand JaneliaFluor 549 pendant 10 minutes, suivi de trois lavages au milieu blanc de 10-15 minutes chacun à 37°C, 5% CO₂. Un tri cellulaire induit par fluorescence (FACS) a ensuite été fait, ce qui a permis de garder les cellules ayant une faible expression de Halo-TCAB1.

Marquage JaneliaFluor

Les cellules exprimant Halo-TCAB1 ont été marquées avec 0.5 nM de JaneliaFluor 646 ou de JaneliaFluor 549 pendant 10 minutes, suivi de trois lavages au milieu blanc de 10-15 minutes chacun à 37°C, 5% CO₂. Par la suite, les cellules ont été utilisées soit pour le SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western, ou pour de l'imagerie cellulaire.

Tri cellulaire induit par fluorescence (FACS)

Les cellules exprimant UBC-Halo-TCAB1 ont été triées au FACS par la plateforme de cytométrie en flux de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC). Pour cela, les cellules ont été marquées avec JaneliaFluor 549, transportées dans du PBS + 2% de sérum fœtal bovin puis triées avec le trieur de cellules BD FACS Aria Illu par le personnel responsable de la plateforme de cytométrie. Les cellules récoltées dans du sérum fœtal bovin ont ensuite été

plaquées dans des pétris avec du milieu complet puis laissées adhérer pendant environ 6h avant de changer le milieu en ajoutant de la gentamicine à 50 µg/mL.

SDS-PAGE et Immunobuvardage de type Western

Les culots cellulaires ont été prélevés et les protéines ont été isolées après avoir lysé les cellules à l'aide d'un tampon RIPA et d'une sonication. Les protéines ont été quantifiées à l'aide de la méthode de Bradford (Bio-Rad) et 20 µg de protéines/échantillon ont été chargées sur le gel SDS-PAGE. Pour les cellules exprimant Halo-TCAB1, le gel a été imagé au ChemiDoc (Bio-Rad) en utilisant un filtre 549.

Pour l'immunobuvardage de type Western, les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été bloquée dans 5 % de lait pendant 1 heure, puis incubée avec différents anticorps primaires de manière indépendante dilués dans du TBS-T + 3% BSA et incubés à 4°C pendant la nuit. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-MYC (1 :250), anti-Tubuline β (1 :10000), anti-TERT (1 :1000), anti-Lamine A/C (1 :1000) et anti-WRAP53 (1 :2000). Les anticorps primaires ont été lavés 3 fois avec du TBS-T avant d'être incubés à nouveau avec un anticorps secondaire anti-Rabbit (1:5000) ou anti-mouse (1:3000) pendant 40 minutes à température ambiante. La membrane a été lavée à nouveau et le signal a été détecté à l'aide du réactif ECL de BioRad.

Immunofluorescence

Les cellules exprimant POT1-myc et les mutants de POT1, ainsi que celles exprimant Halo-TCAB1, ont été plaquées et fixées sur des lamelles avec de la paraformaldéhyde 4%. Après perméabilisation avec 0.5% de Triton X-100, une première incubation avec, respectivement, un anticorps primaire anti-MYC (1 :250) et un anticorps anti-WDR79 (1 :1000) a été faite. Par la suite, plusieurs lavages ont été effectués au PBS-Tween 0.1% avant une seconde incubation avec les anticorps secondaires anti-rabbit Alexa 488 (1 :7000). D'autres lavages au PBS-Tween 0.1% ont ensuite été fait avant de procéder au montage avec du Vectashield (Vector laboratories) contenant du DAPI pour colorer les noyaux. L'imagerie a été faite soit la journée même ou le lendemain.

Transfection cellulaire

Les lignées cellulaires exprimant Halo-TACB1 ont été plaquées dans des fluorodish puis transfectées avec 250µL de tampon jetPRIME contenant 100 ng ou 200ng des plasmides pHage2-EF1a-TagBFP-hCoilin ou pHage2-EF1a-TagBFP-nucleolin respectivement. Après 24h, le milieu des cellules transfectées a été changé pour du nouveau milieu. Les cellules ont été imagées environ 36h après la transfection.

Imagerie cellulaire au microscope

Toutes les cellules ont été plaquées dans des pétris à fond en verre (Fluorodish FD35-100 WPI) de 35mm deux jours avant la séance d'imagerie au microscope confocal à disque rotatif dans le milieu blanc *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Mutlicell, 319-050 CL) complété 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco, 12483-020), 2 mM de L-analyl-L-glutamine (glutaMAX, Gibco, 35050-061) et 100 IU de pénicilline-streptomycine (Multicell, 450201-EL). Avant la session d'imagerie, le milieu a été changé pour le même milieu mais ayant en plus de tampon HEPES pH7.4 à 25mM.

Microscope confocal a disque tournant (*Spinning Disk*)

Les cellules ont été imagées sur un microscope confocal inversé Zeiss Axio-Observer Z1 Yokogawa CSU-X1 à disque tournant et les images ont été acquises avec un objectif à huile 100X NA 1,46. La taille des pixels des images obtenues était de 0,133 µm. Le *Zeiss TempModule* a été mis à 37 °C une heure avant l'imagerie afin de permettre à tous les composants de la chambre d'imagerie d'atteindre la température appropriée. Les différents lasers (488 nm 100mW diode et 561 nm 40mW diode) ont été allumés au moins une heure avant l'imagerie. L'imagerie de hTR-GFP, mCherry-Cdt1 et mCherry-hTRF1 a été faite en *Dual camera*. Pour cela, les cellules ont été excitées simultanément avec les lasers 488 nm et 561 nm. Le logiciel *Zeiss Dual camera calibration Wizard* a été utilisé pour appliquer une transformation Affine (translation + rotation) à l'image laser de 561 nm avec une lame de tissu multifluorescent pour calibrer l'image et avoir un bon alignement des images. Ces dernières ont été acquises en continu avec un temps d'exposition de 70 ms (plus un transfert de 30 ms, ce qui a entraîné un intervalle de 100 ms) pour 100 images sur les deux caméra EMCCD *Evolve* de Photometrics : 512×512 pixels de 16 µm chacun, 33 fps.

Les films courts ont été pris pendant 10 secondes avec un intervalle de 70ms et les longs ont été pris pendant 5 minutes avec un intervalle de 2 secondes.

Microscope super résolution ELYRA

Les cellules ont été visualisées et les images ont été prises avec un objectif à l'huile 100X NA 1.46 sur un microscope à super résolution Zeiss Elyra PS.1 équipé d'une caméra Andor EMCCD iXon3 DU-885 CSO VP461 (1004x1002 pixels) en mode HiLo (*highly inclined and laminated optical sheet*). En microscopie HiLo, le laser est dirigé à un angle aigu à travers l'échantillon, ce qui permet d'imager en profondeur contrairement à de la microscopie TIRF (*Total internal reflection fluorescence*) qui permet d'imager seulement en surface. Aussi, le mode HiLo, permet de diminuer le bruit de fond, menant ainsi à un meilleur ratio signal/bruit de fond. La taille des pixels des images obtenues était de 0.159 μm . Les différents lasers utilisés (642 nm comprenant une diode HR de 150 mW et 405 nm comprenant une diode HR de 50 mW) ont été allumés au moins 30 minutes à l'avance. Par la suite, les cellules ont été imagées avec le laser 642 nm pour observer les particules de Halo-TCAB1 et un film a été pris pendant 20 secondes à intervalle de 40 ms. Finalement, une image a été prise avec le laser 405 nm pour imager les CB ou le nucléole de manière indépendante.

Analyse d'image

Pour les images prises en *Dual camera*, les films en format czi ont été exportés en format OME TIFF avec le logiciel ZEN 3.0 (blue edition) pour conserver l'alignement fait après la transformation affine. Les fichiers OME TIFF ont été analysés avec FIJI. Une macro FIJI a été écrite pour semi-automatiser le prétraitement d'image. Pour résumer, une correction du photoblanchiment est faite, suivi d'une correction du bruit de fond. Pour le film mCherry-Cdt1/mCherry-TRF1, un filtre *Mexican Hat Filter* est utilisé pour appliquer une différence de gaussiennes (*Laplacian of the Gaussian*) afin de bien définir les particules, avant de créer une image binaire pour définir un masque de chaque télomère. L'outil TrackMate est par la suite utilisé pour le suivi des particules uniques de hTR. La matrice de détection des particules a été configurée à 4 pixels (0.53 μm), le filtre médian et localisation sous-pixel ont été activés. *LAP tracker* a été utilisé pour le suivi des particules, avec une distance maximale de 0.8 μm et aucun *gap* pour hTR et une distance maximale de 0.2 μm et 2 *gaps* de 0.2 μm pour les télomères.

Pour les images en caméra simple, la même approche a été utilisée mais aucun export en OME TIFF n'a été fait. Aussi, les paramètres de TrackMate étaient les suivants : matrice de détection des particules 4 pixels ($0.53\mu\text{m}$), le filtre médian et localisation sous-pixel ont été activés. *LAP tracker* a été utilisé avec une distance maximale de $0.8\mu\text{m}$ et aucun *gap* pour hTR et les télomères. L'analyse d'image finale a été faite avec le programme DCTracker développé durant ce projet.

Analyse statistique

Les analyses quantitatives ont été faite avec un minimum de deux ou trois réplicas indépendants. Pour les données distribuées normalement, un test T de student a été fait pour déterminer les significations statistiques. Pour les données qui ne suivent pas une distribution normale, un test Wilcoxon a été fait. La médiane est représentée dans les figures.

Chapitre 3 – Résultats

Programme d'analyse d'images

L'utilisation de la microscopie *Dual camera* (*i.e.* deux caméras qui imagent une longueur d'onde différent) permet de mesurer en temps réel la position de deux types de molécules dans le même plan focal dans une cellule vivante. Ceci permet donc de mesurer avec précision des interactions entre deux molécules dans les cellules. Couplée avec de l'imagerie multicanal, il est possible d'ajouter de l'information sur la position de compartiments cellulaires spécifiques et ainsi observer des différences entre l'interaction des particules dans différents compartiments cellulaires. Afin de tirer pleinement profit de la puissance de ces méthodes d'imagerie, un pipeline versatile capable d'analyser des images de microscopie multicanal dans plusieurs contextes a été mis au point. Afin de permettre l'utilisation du pipeline dans le plus de contexte possible, celui-ci a été séparé en trois modules : un script Fiji pour semi-automatiser l'analyse des images, le script DCTracker qui identifie les co-localisation et des scripts accessoires qui extraient l'information nécessaire pour produire les figures à partir du fichier de sortie de DCTracker (Figure 14) (disponible sur demande; <https://github.com/drs/DCTracker>).

Description de l'algorithme de DCTracker

Le script DCTracker est au centre de cette analyse et a été construit de sorte à imiter l'analyse effectuée par un utilisateur manuel (*i.e.* identifier visuellement les co-localisations de molécule sur des images de microscopie (72)). Ce programme peut identifier les co-localisations entre un nombre théoriquement illimité de canaux d'imagerie. Les fichiers d'entrée peuvent être des films (pour les molécules à déplacement rapide), des images fixes (pour des compartiments cellulaires qui se déplaceront peu pendant l'analyse) ainsi qu'une combinaison d'un ou de ces deux types de données. Le type de données ainsi que les paramètres de l'analyse sont définis dans un fichier de configuration de DCTracker spécifique à chaque type d'analyse. Selon le type de données, le programme peut accepter trois formats de données pour les particules : un masque binaire (grosse particule; une seule image), un masque binaire et un fichier TrackMate (grosse particule; film) ou un fichier TrackMate seul (petite particule; film).

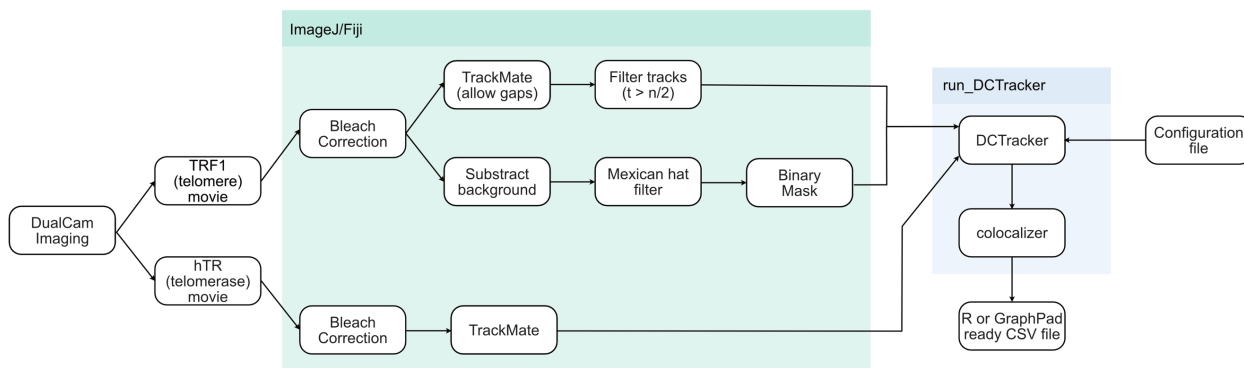


Figure 14: Organigramme du pipeline DCTracker. Les vidéos produites lors de l'imagerie en *Dual camera* sont d'abord analysées dans un script Fiji qui effectue le pré-traitement des images et produit des masques et les fichiers TrackMate nécessaire à l'analyse DCTracker. Ces fichiers sont ensuite analysés dans DCTracker puis dans les scripts accessoires.

Le script DCTracker est composé de deux étapes principales. Un tableau de la position de l'ensemble des molécules est d'abord construit, puis les co-localisations sont identifiées à partir de l'intersection de ces tableaux. La construction du tableau de position s'effectue différemment lorsqu'un masque binaire est fourni que lorsqu'un seul fichier TrackMate est utilisé. Lorsqu'un masque est fourni, la position des molécules ou des compartiments est déterminée par *connected-components labelling* (avec un algorithme similaire à celui de l'algorithme *depth first search* pour l'analyse des graph). En résumé, un premier pixel est identifié (le premier pixel positif rencontré en absence de fichier TrackMate ou le centroïde lorsqu'un fichier TrackMate est fourni), puis l'algorithme parcourt les pixels adjacents à ce pixel jusqu'à ce que tous les pixels positifs de la région aient été visités (Figure 15B). L'ensemble des pixels appartenant à cette région reçoivent ensuite un même numéro unique et l'analyse du reste de l'image continue (Figure 15D-E). En absence de masque, la position de la particule sur l'image est définie par un rayon (indiqué dans le fichier de configuration) à partir du centroïde (Figure 15C).

Afin d'identifier les particules qui colocalisent, les tableaux de position de l'ensemble des particules sont mis en relation (Figure 15F). Pour les films, chaque position des particules pour un temps spécifique sont mises en relation avec les positions des autres canaux pour le même temps afin d'identifier les particules qui colocalisent. Pour les images uniques (présent au début et/ou à la fin du film), le temps n'est pas pris en compte et la même image est utilisée pour comparer les positions.

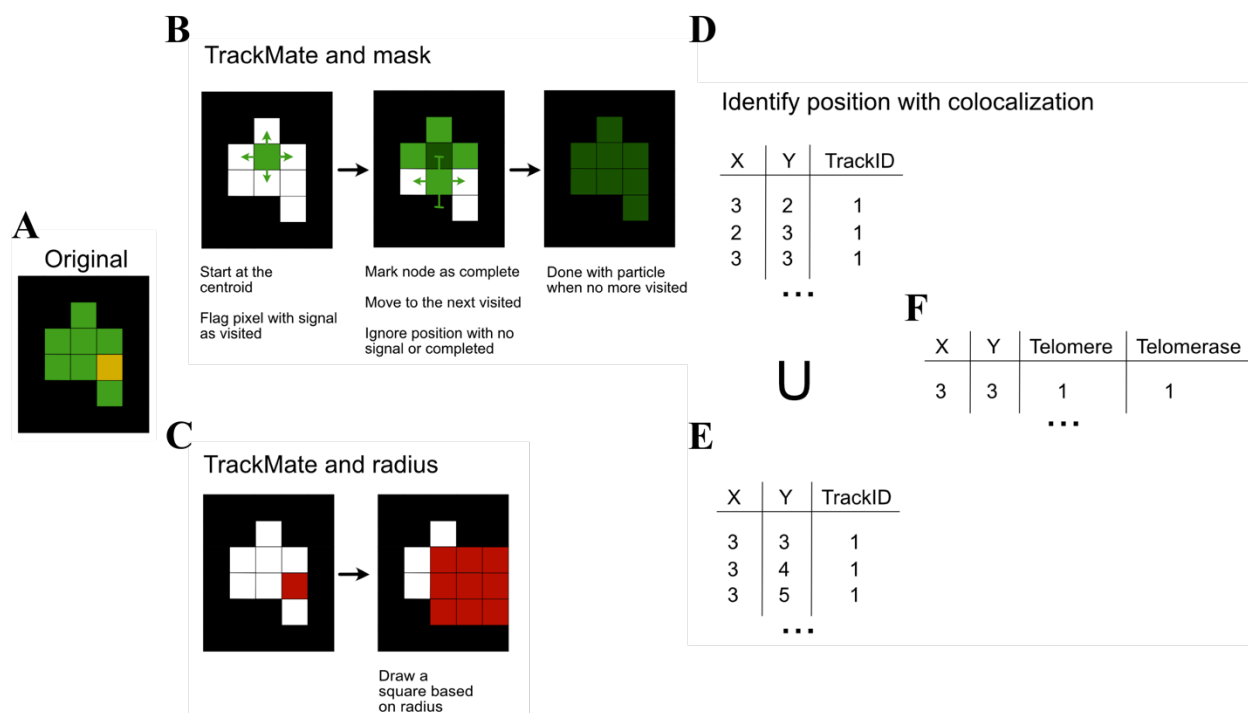


Figure 15: Algorithme de DCTracker. Le scripts DCTracker accepte comme entrée des fichiers fixes (*i.e.* sans TrackMate) et des films (*i.e.* avec TrackMate). En vert est représenté une particule de télomère et en rouge une particule de télomérase. Le pixel jaune correspond à la colocalisation du centroïde de la télomérase sur le télomère (A). **1)** Lorsqu'un masque est fourni, la position des particules est déterminée selon un algorithme de *connected-components labelling* (B) en commençant par le centroïde donné par TrackMate. **2)** Dans le cas où seul un fichier TrackMate est fourni, la position d'une particule est déterminée selon le rayon de la particule (C) à partir du centroïde donné par Trackmate. **3)** Les positions des particules sont ensuite mises en relation pour déterminer les particules qui colocalisent (D, E et F).

Afin d'évaluer si l'analyse automatique des images produit un résultat similaire à l'analyse manuelle, le programme DCTracker a été comparé avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire (72). Pour cela, les fichiers TrackMate générés à partir des données brutes ont été repris. De plus, des masques binaires ont été générés à partir des images brutes des télomères utilisées pour l'analyse manuelle. DCTracker a ensuite été utilisé pour faire l'analyse. Les résultats publiés (dont la figure a seulement été régénérée) ont révélé une médiane d'environ 26% de télomères visités par hTR pour POT1 WT et d'environ 38% pour POT1 Δ OB, soit augmentation d'environ

12% des colocalisations de hTR aux télomères en présence du mutant POT1 Δ OB (Figure 16). Un résultat similaire a été obtenu par l'analyse avec DCTracker, où nous observons une différence d'environ 11% entre une médiane : environ 32% de télomères visités par hTR pour POT1 WT et environ 43% pour POT1 Δ OB (Figure 16). Un écart similaire entre les médianes est donc obtenu avec DCTracker malgré un décalage vers le haut des valeurs des deux conditions, qui sont potentiellement causées par une différence dans l'interprétation des colocalisations.

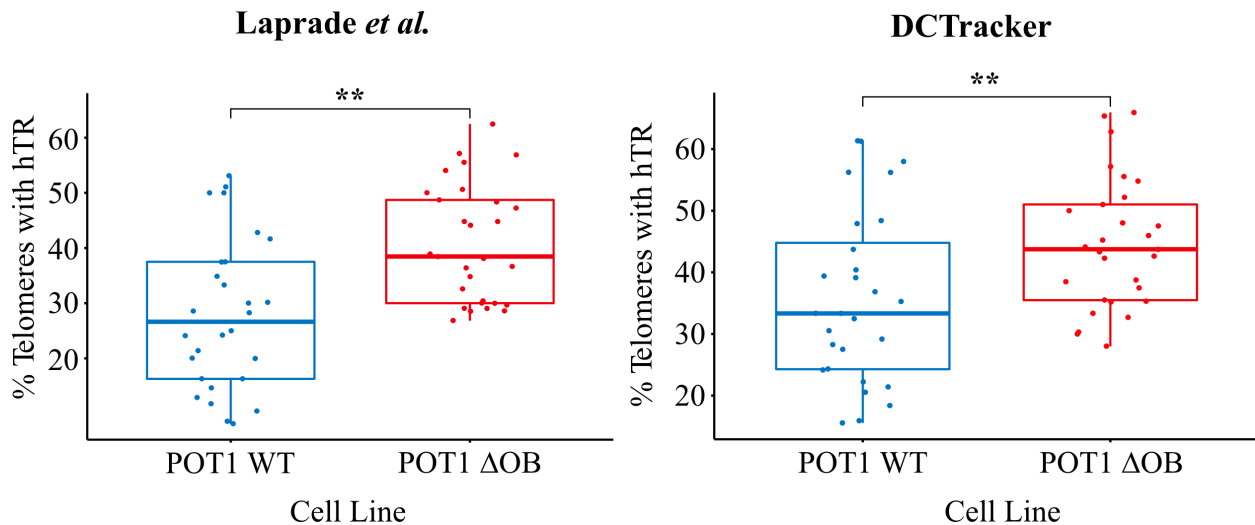


Figure 16: L'analyse automatique DCTracker confirme les résultats obtenus par Laprade *et al.* Les données de Laprade *et al.* ont été ré-analysées automatiquement en utilisant le pipeline DCTracker. Les résultats de DCTracker ont confirmé les résultats précédemment obtenus (72). N= 29 cellules exprimant POT1- Δ OB et 28 cellules exprimant POT1-WT. **p < 0.01.

Effet de la mutation POT1-K90E sur le recrutement de la télomérase aux télomères.

La mutation K90E de POT1 est liée à une élongation anormale des télomères sans pour autant affecter la liaison de POT1 à l'ADN télomérique simple brin. De plus, cette mutation se trouve dans le premier domaine *OB-fold* de POT1 et nos travaux ont montré que la délétion du premier domaine *OB-fold* de POT1 engendrait une augmentation du recrutement de la télomérase aux télomères (72). Ainsi, il est intéressant de voir si le même phénotype est observé avec le mutant K90E de POT1.

L'étude de l'impact de la mutation K90E de POT1 sur le recrutement de la télomérase aux télomères nécessite la construction d'une lignée cellulaire HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 exprimant la protéine mutante similaire à celle utilisée précédemment pour évaluer l'impact du mutant POT1- Δ OB (72). Comme la plupart des mutations dans les domaines OB-fold de POT1 observés dans les cancers (112), les mutants POT1- Δ OB et K90E sont dominants-négatifs et leur phénotype s'exprime même en présence de copies sauvage de POT1 (98,114). Pour cela, le cDNA myc-POT1-K90E a été cloné dans un plasmide pHAGE-EF1a-POT1-WT-IRES-puro (72) par digestion avec des enzymes de restriction et ligation. La présence du gène muté a été confirmée par séquençage Sanger. Des vecteurs lentiviraux ont ensuite été produits dans des cellules 293FT en utilisant ce vecteur, ainsi que les vecteurs pHAGE-EF1a vide ou exprimant les protéines myc-POT1-WT ou myc-POT1- Δ OB. Les cellules HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 (72) ont ensuite été infectées avec ces lentivirus pour générer les lignées cellulaires exprimant ces protéines. Le niveau d'expression des protéines POT1 WT, Δ OB et K90E a été vérifié par immunobuvardage de type Western (Figure 17A). Ce résultat montre que les protéines POT1 WT, Δ OB et K90E sont bien exprimées dans lignées cellulaires générées (Figure 17A). La localisation des protéines POT1 WT, Δ OB et K90E aux télomères dans ces lignées cellulaires a ensuite été validée pour confirmer la présence de ces protéines aux télomères. Cette colocalisation a été observée par immunofluorescence et les résultats obtenus montrent que les protéines POT1 WT, Δ OB et K90E sont présentes aux télomères dans toutes les lignées cellulaires, ce qui suggère que les constructions myc-POT1 sont fonctionnelles (Figure 17B)

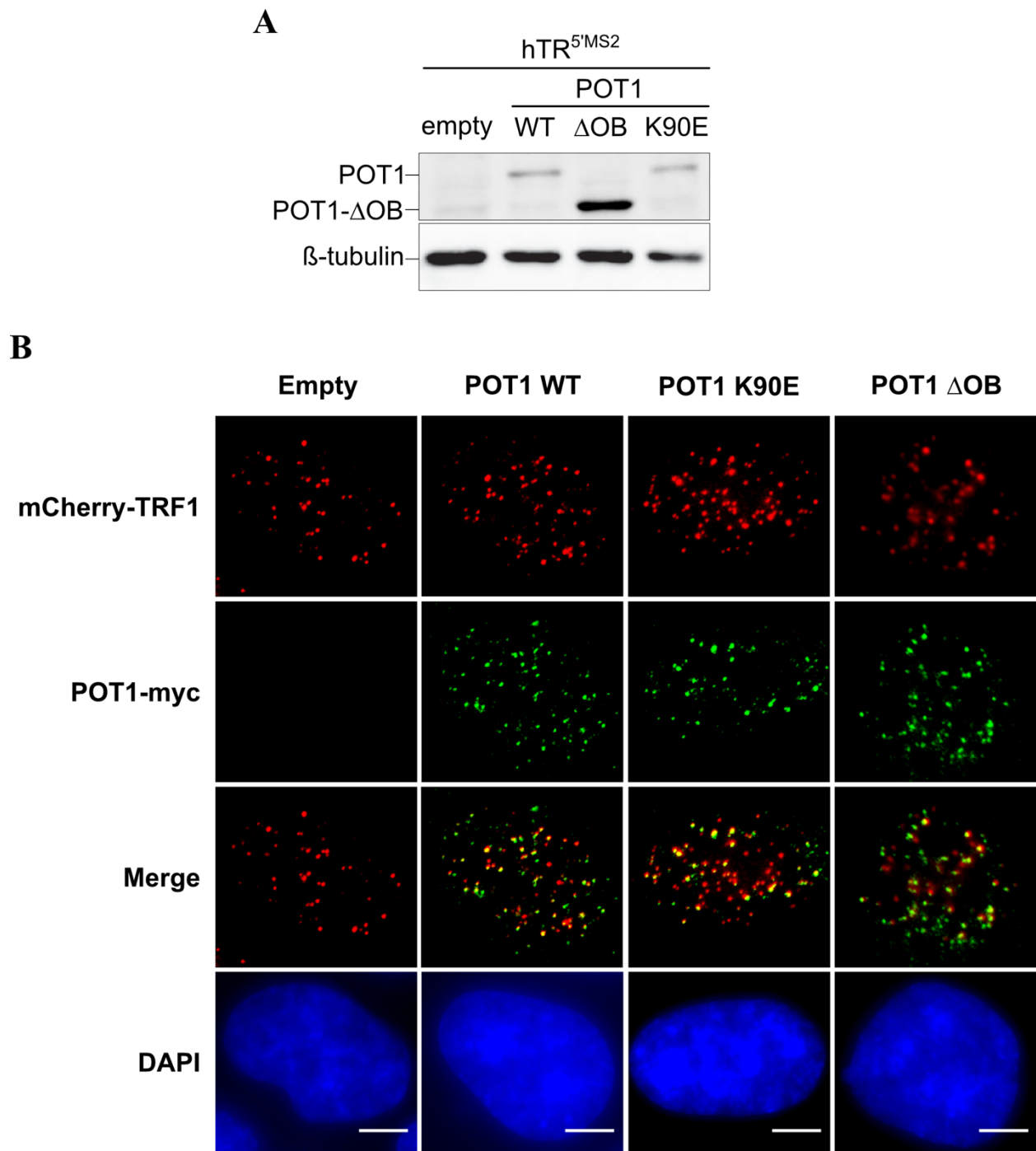


Figure 17: Validation de l'expression et de la localisation de la protéine myc-POT1. (A) L'expression des protéines POT1-WT, POT1-K90E et POT1- Δ OB a été validée par immunobuvardage de type Western. Pour cela, un anticorps anti-MYC a été utilisé pour détecter l'épitope myc des protéines POT1, suivi d'un anticorps anti-tubuline β comme contrôle de chargement. (B) Visualisation de la localisation des protéines POT1-WT, POT1-K90E et POT1-

Δ OB par immunofluorescence. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps primaire anti-MYC et l'anticorps secondaire AlexaFluor 488 (vert). La protéine mCherry-TRF1 est déjà exprimée dans les cellules et marque les télomères (rouge). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Barre de l'échelle : 10 μ m.

Les expériences précédentes effectuées au laboratoire sur le mutant POT1- Δ OB ont été faites sur des lignées cellulaires sur-exprimant la protéine hTERT afin d'augmenter le nombre de complexes télomérase mesurables dans les cellules (72). Cependant, afin d'éviter de potentiels biais causés par la surexpression de hTERT et parce que l'analyse automatique des données faciliterait grandement l'analyse, la possibilité d'utiliser des lignées cellulaires ne sur-exprimant pas hTERT a été évaluée. Pour ce faire, les lignées cellulaires précédemment construites ont été infectées avec des particules lentivirales exprimant MCP-sfGFP. La dynamique de recrutement de MS2-hTR aux télomères a été mesuré pendant 10 secondes, tel qu'effectué précédemment (72). En somme, l'acquisition d'image a été faite au microscope confocal à disque rotatif en utilisant du *Dual-camera*. Les interactions des particules de hTR aux télomères ont été analysées à l'aide du programme DCTracker. Les résultats obtenus montrent que dans les conditions d'acquisition, le nombre de particules uniques de télomérase qui peuvent être suivies est faible (Figure 18A). Ainsi, la quantification de la colocalisation montre que le nombre d'évènement d'interactions mesuré est trop faible pour pouvoir observer l'impact des mutants de POT1 (Figure 18B).

Afin d'obtenir un nombre suffisant d'interactions, la protéines hTERT a donc été surexprimée dans les lignées cellulaires exprimant myc-POT1. Pour ce faire, elles ont été infectées avec les vecteurs lentiviraux pHage2-EF1a-TERT-IRES-Puro produits dans les cellules 293FT. Le niveau d'expression de hTERT a été validée par immunobuvardage de type Western et a permis de confirmer la surexpression de hTERT dans toutes les lignées cellulaires (Figure 18D). Comparativement aux cellules exprimant hTERT endogène, le suivi des particules de MS2-hTR en utilisant l'outil TrackMate est possible (Figure 18C, <https://figshare.com/s/a54e8e3edc2b8ef9fc5c>).

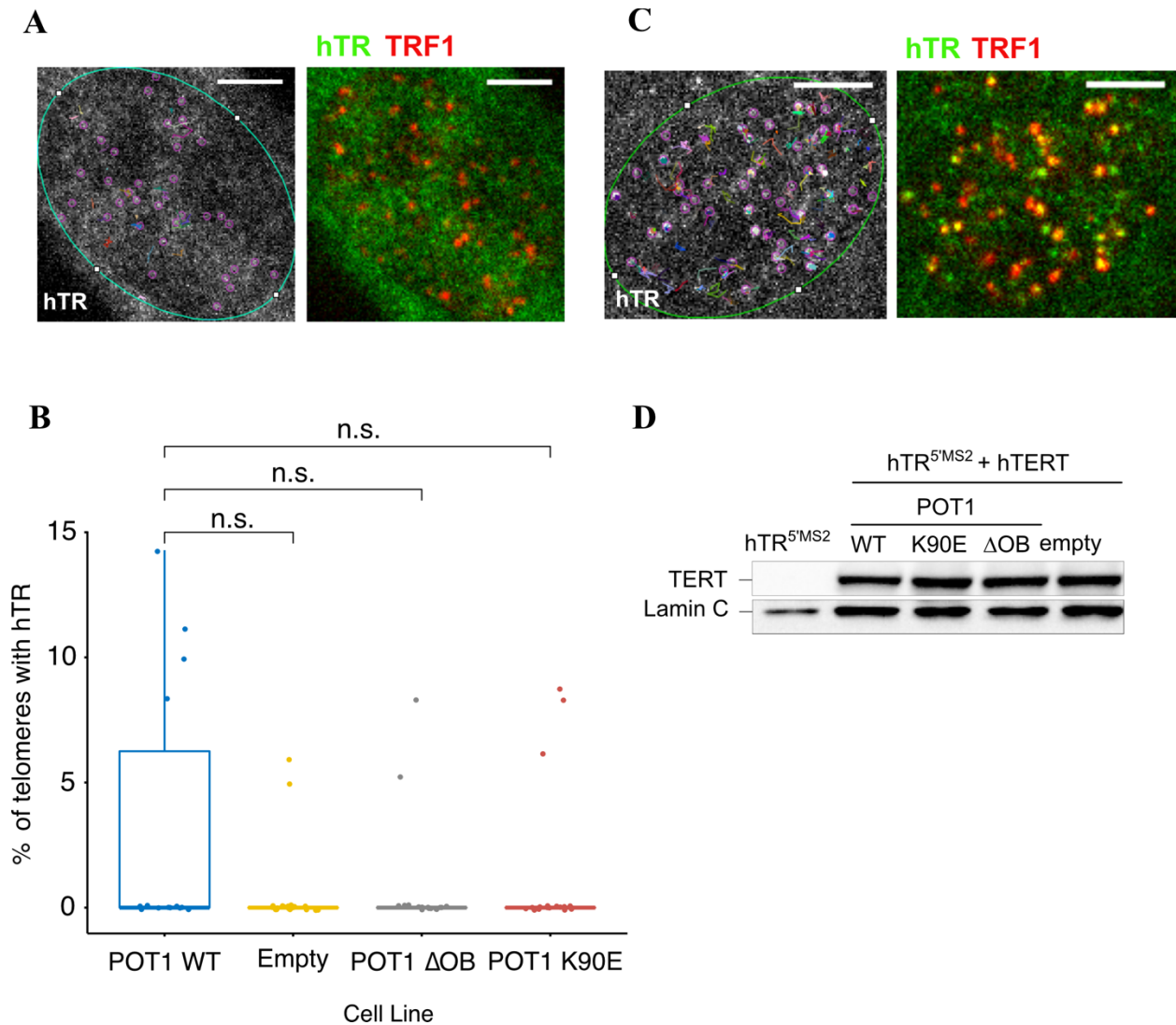


Figure 18: Le suivi des particules de hTR est possible seulement dans le cas où hTERT est surexprimé. (A) Très peu de particules de hTR sont observables dans la cellule. L’outil TrackMate a été utilisé pour suivre les particules de hTR. Barre d’échelle : 5µm. **(B)** Aucune différence dans le recrutement de la télomérase aux télomères ne peut être observée entre les différentes lignées cellulaires due au faible nombre de particules de hTR détectées. Le graphique représente le pourcentage de colocalisation de hTR aux télomères dans des cellules exprimant les différents variants de POT1. N = 15 cellules exprimant chacun des construits. n.s. $p > 0.05$. **(C)** Des particules de hTR sont visibles (vert) et colocalisent avec les télomères, marqués avec mCherry-TRF1 (rouge) dans une cellule sur-exprimant hTERT. L’outil TrackMate a permis de suivre les particules de hTR. Barre d’échelle : 5µm. **(D)** L’expression de la protéine hTERT a été validée par Western

Blot. Pour cela, un anticorps anti-TERT a été utilisé suivi d'un anticorps anti-lamine C comme contrôle de chargement.

Afin d'évaluer l'impact du mutant de POT1 K90E sur le recrutement de la télomérase aux télomères, la dynamique d'interaction entre ces facteurs a été mesurée dans les lignées cellulaires sur-exprimant les mutants de POT1 et hTERT. Ces interactions peuvent être séparées en deux groupes principaux : les interactions rapides (qui reflètent le mode de scanning de la télomérase aux télomères) et les interactions longues (élongation des télomères) (Figure 13). En raison des limitations techniques (*e.g.* photoblanchiment) l'observation de ces différentes interactions est impossible en une seule expérience et il est nécessaire de les observer séparément. Ainsi, de courts films (10 secondes) avec peu d'intervalle entre les images permet de mieux caractériser la dynamique des courtes interactions de recrutement, alors que des films longs (5 minutes) avec des temps d'intervalle plus longs entre les images permet de capturer les interactions longues d'élongation.

L'impact du mutant K90E de POT1 a donc été déterminé sur la dynamique de recrutement ainsi que sur l'élongation des télomères par la télomérase. Pour ce faire, les lignées cellulaires sur-exprimant myc-POT1 et hTERT ont été infectées avec des particules lentivirales exprimant MCP-sfGFP. L'acquisition d'image a été faite au microscope confocal à disque rotatif en utilisant du *Dual-camera*. La dynamique de recrutement a été mesurée à partir de films de 10 secondes avec un intervalle de 100 ms entre chaque image (Figure 19) et l'élongation des télomères a été mesurée à partir de films de 5 minutes avec 2 secondes entre chaque image (Figure 20). Les interactions des particules de hTR aux télomères ont été analysées à l'aide du programme DCTracker.

Pour ce qui est du recrutement de la télomérase, les résultats montrent qu'il y a une différence significative dans la proportion de télomères associés à une particule de hTR entre les lignées cellulaires exprimant POT1-WT comparativement aux lignées exprimant POT1- Δ OB et POT1-K90E (Figure 19A). Ainsi, nous observons une augmentation du pourcentage médian de télomères associés avec une particule de hTR dans les cellules exprimant POT1- Δ OB et POT1-K90E, passant de 42% dans les cellules exprimant POT1 WT à environ 59% dans les cellules exprimant POT1- Δ OB et POT1-K90E. Cependant, les temps de résidence de hTR aux télomères sont différents dans les lignées POT1-WT comparativement au vecteur vide et au POT1- Δ OB mais pas comparativement au POT1-K90E (Figure 19B). Ces résultats suggèrent qu'il y a

principalement une augmentation de l'accès de la télomérase aux télomères dans le cas du mutant POT1-K90E, mais pas dans le temps de résidence de la télomérase lors de la mesure des interactions courtes.

Lors de l'analyse des interactions longues entre les particules de hTR et les télomères, nous observons que le pourcentage de télomères ayant reçue une interaction longue (>10 secondes; possiblement une élongation) est significativement plus élevée dans les lignées cellulaires exprimant POT1- Δ OB et POT1-K90E que dans les lignées cellulaires exprimant POT1-WT (Figure 20A), avec un pourcentage médian de 71% pour les lignées exprimant POT1- Δ OB ou POT1-K90E comparativement à un pourcentage médian de 53% pour la lignée exprimant POT1 WT. De plus, le temps de résidence des particules de hTR aux télomères a augmenté dans les cellules exprimant POT1- Δ OB et POT1-K90E, passant de 21 secondes pour la lignée exprimant POT1 WT à 25 et 28 secondes respectivement pour les lignées exprimant POT1 Δ OB et POT1 K90E (Figure 20B). Ces résultats suggèrent que les télomères sont plus accessibles à la télomérase dans le cas des mutants POT1-K90E et POT1- Δ OB. De plus, il est à noter que le mutant POT1-K90E présente le même phénotype que le mutant présentant la délétion du domaine OB-fold (POT1- Δ OB).

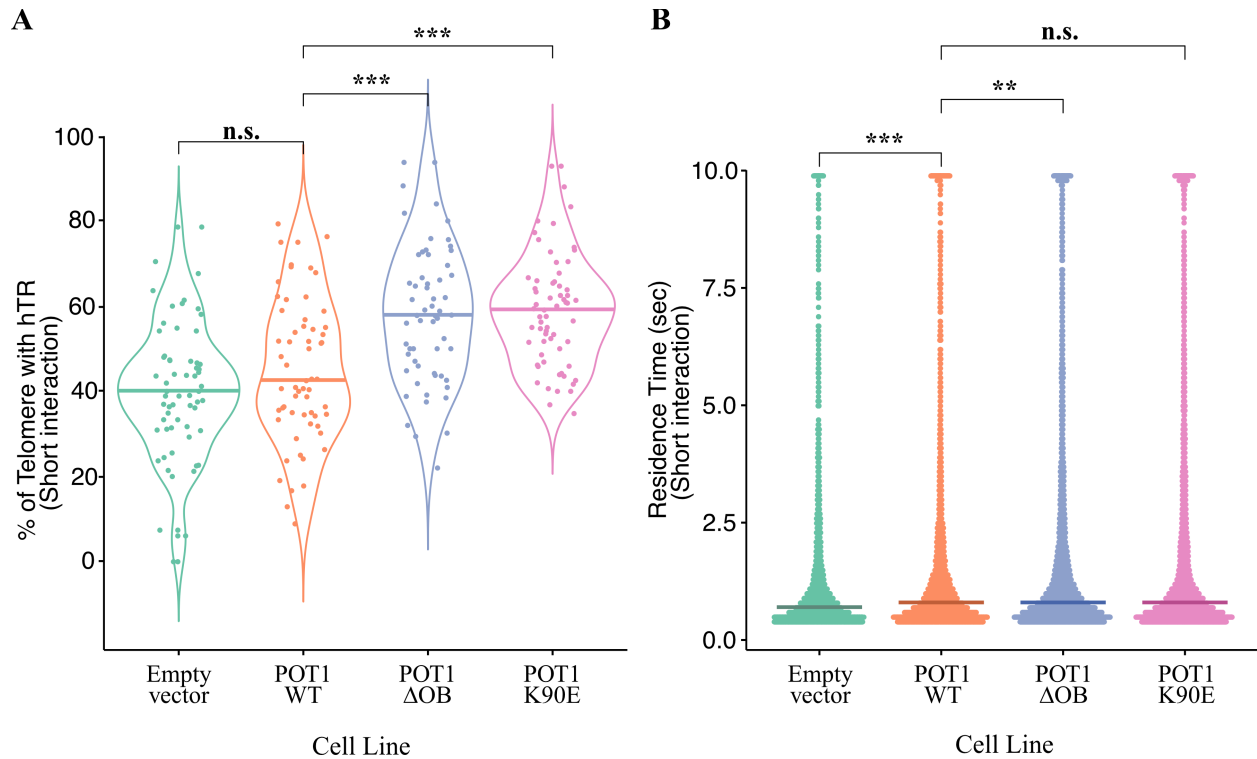


Figure 19: Les mutants de POT1 ont une incidence sur le recrutement de la télomérase aux télomères. Le recrutement (A) et le temps de résidence (B) de hTR aux télomères ont été évalués en utilisant DCTracker. Les barres horizontales représentent la médiane : (A) POT1 WT : 42% ; Empty vector : 40 % ; POT1 ΔOB : 59% POT1 K90E : 60%. (B) : POT1 WT : 1.48s ; Empty vector : 1.83s ; POT1 ΔOB : 1.91s ; POT1 K90E : 1.52s. N = 60 cellules pour chaque lignée analysée. Les différentes conditions ont été comparées en utilisant un test T de student (A) et un test de Wilcoxon (B). n.s. $p > 0.05$, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$.

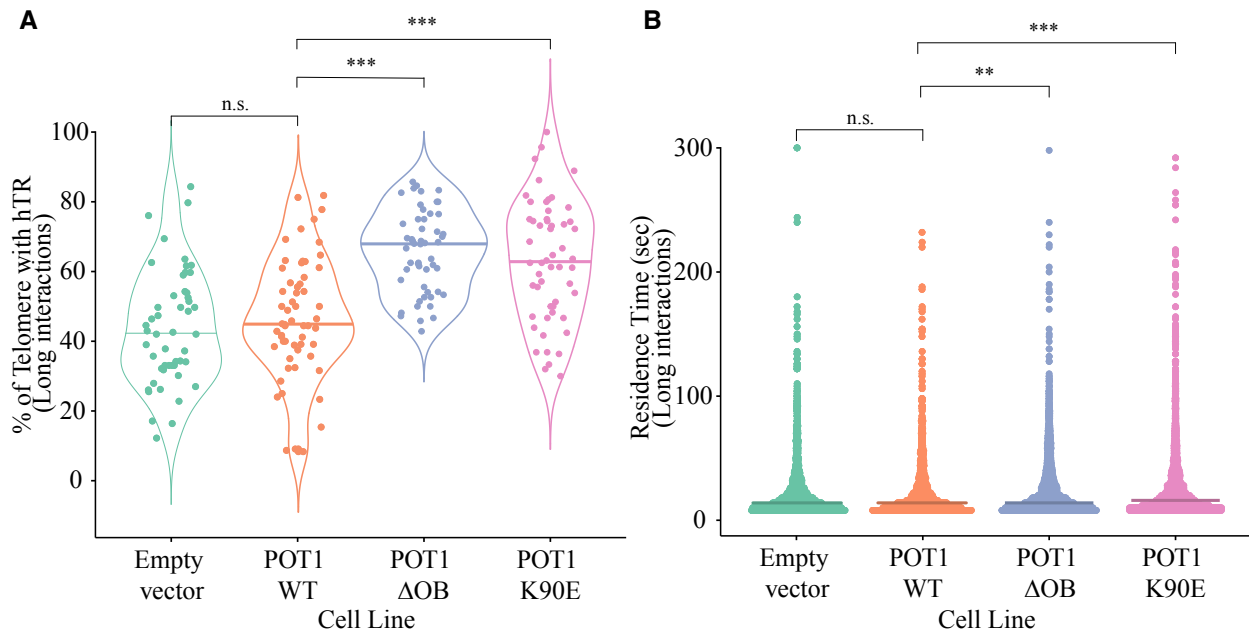


Figure 20: Les mutants de POT1 ont une incidence sur les interactions longues entre la télomérase et les télomères. Le recrutement (A) et le temps de résidence (B) de hTR aux télomères ont été évalués en utilisant DCTracker. Les barres horizontales représentent la médiane (A) POT1 WT : 53% ; Empty vector : 50 % ; POT1 ΔOB : 70% POT1 K90E : 72%. (B) : POT1 WT : 21.8s ; Empty vector : 22.7s ; POT1 ΔOB : 25s ; POT1 K90E : 28.6s. N = 60 cellules exprimant chacun des construits. Les différentes conditions ont été comparées en utilisant un test T de student (A) et un test de Wilcoxon (B). n.s. $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Effet de la protéine TCAB1 sur la localisation de hTR

Il a précédemment été démontré que TCAB1 contribue à la localisation de hTR dans les Cajal bodies (72). De plus, des mutations dans TCAB1 sont associées à une augmentation de hTR au nucléole (50). Cependant, à quel moment dans la biogénèse de la télomérase TCAB1 s'associe avec hTR et quel est le rôle de TCAB1 dans le trafic de hTR entre le nucléole, le nucléoplasme et les Cajal bodies demeurent des questions non résolues. Afin de pouvoir analyser le rôle de TCAB1 dans le trafic de hTR par imagerie en molécule unique, une lignée cellulaire HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1^{-/-} (72) exprimant la protéine de fusion Halo-TCAB1 a été produite. Pour cela, le gène HaloTag et TCAB1 ont été cloné dans un plasmide pHAGE-EF1a-Halo-TERT-IRES-puro par digestion avec des enzymes de restriction et ligation. La présence du cDNA Halo-TCAB1 a été confirmé par séquençage Sanger. Nous avons obtenu quatre clones positifs (A, B, C et D) avec

lesquels des vecteurs lentiviraux ont ensuite été produits dans des cellules 293FT. Les cellules HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1^{-/-} ont été infectées avec ces lentivirus pour générer les lignées cellulaires exprimant cette protéine. Le niveau d'expression de Halo-TCAB1 a été vérifié par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-TCAB1 pour vérifier la partie TCAB1 (Figure 16A) et par marquage avec le fluorophore JaneliaFluor549 et SDS-PAGE pour vérifier la partie HaloTag (Figure 21B). Nos résultats montrent que les lignées cellulaires exprimant les clones C et D expriment la protéine Halo-TCAB1, mais pas les lignées A et B qui expriment des protéines tronquées (Figure 21A) ; la lignée A présente uniquement le HaloTag de 33 kDa (Figure 21B). La localisation de Halo-TCAB1 aux Cajal bodies dans ces lignées cellulaires a ensuite été validée par immunofluorescence. Les résultats obtenus montrent que Halo-TCAB1 est présent aux Cajal bodies dans la lignée cellulaire complémentée, ce qui suggère que la protéine de fusion Halo-TCAB1 est fonctionnelle (Figure 21C).

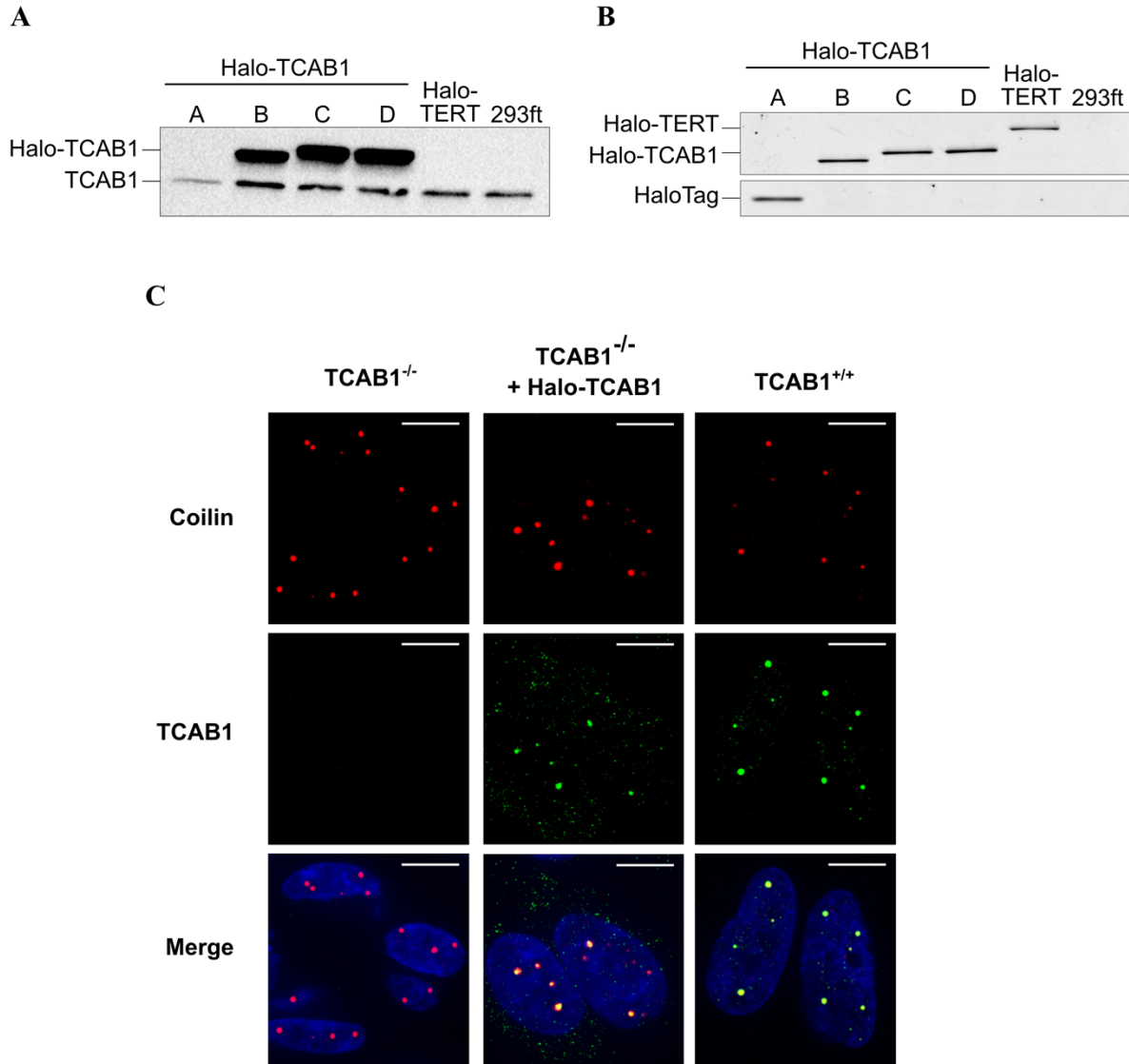


Figure 21: Validation de l'expression et de la localisation de la protéine Halo-TCAB1.

L'expression des clones A à D de la protéine Halo-TCAB1 a été validée par (A) immunobuvardage de type Western. Pour cela, un anticorps anti-TCAB1 a été utilisé pour valider la taille de la protéine TCAB1 dans les cellules 293FT transfectées. (B) La partie HaloTag des clones a été validée par imagerie fluorescente au ChemiDoc sur un gel SDS-PAGE. Pour cela, un marquage des cellules avec le ligand JaneliaFluor549 a préalablement été fait avant la lyse cellulaire. (C) Visualisation de la localisation de la protéine Halo-TCAB1 clone C infectée par immunofluorescence. Les cellules transfectées avec le clone C puis ont été marquées avec

l'anticorps primaire anti-TCAB1 et l'anticorps secondaire AlexaFluor 488 (vert) ainsi que l'anticorps primaire anti-coilin suivi de l'anticorps secondaire AlexaFluor 594 (rouge). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Barre de l'échelle : 10µm.

En raison du niveau d'expression élevé de Halo-TCAB1 dans les lignées cellulaires produites, des résultats préliminaires ont démontrés que l'observation de particules uniques de Halo-TCAB1 était difficile. Afin de permettre l'analyse de Halo-TCAB1 par imagerie en molécule unique, la protéine de fusion Halo-TCAB1 a été exprimée à un niveau similaire au niveau endogène en utilisant le promoteur du gène Ubiquitine C (UBC). Pour ce faire, le promoteur UBC a été cloné dans le plasmide pHAGE-EF1a-Halo-TCAB1-IRES-puro précédemment construit pour remplacer le promoteur EF1a par digestion avec des enzymes de restriction et ligation. Des vecteurs lentiviraux ont ensuite été produits dans des cellules 293FT en utilisant ce vecteur. Les cellules HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1^{-/-} ont ensuite été infectées avec ce lentivirus pour générer les lignées cellulaires exprimant la protéine d'intérêt. Pour cela, un tri cellulaire induit par fluorescence (FACS) a été fait pour sélectionner les cellules ayant un niveau d'expression de Halo-TCAB1 similaire (*i.e.* pour enlever les cellules négatives et celles qui expriment fortement Halo-TCAB1). Le niveau d'expression de Halo-TCAB1 a ensuite été validé par immunobuvardage de type Western. Les résultats montrent que les constructions UBC-Halo-TCAB1 expriment la protéine Halo-TCAB1 à un niveau similaire que la protéine TCAB1 endogène (Figure 22A-B). La capacité à imager des particules uniques de Halo-TCAB1 a été confirmée par microscopie de cellules vivantes au microscope à super résolution en mode HiLo. Pour ce faire, les Cajal bodies et le nucléole ont été marqués en utilisant, respectivement, la BFP-coilin et BFP-nucleolin, suivi d'une coloration des cellules au fluorophore JaneliaFluor 646 pour marquer Halo-TCAB1. L'utilisation de l'outil TrackMate du logiciel Fiji nous a permis de voir que le suivi de molécules uniques de Halo-TCAB1 est possible dans des cellules vivantes (Figure 22C). De plus, ces résultats montrent que Halo-TCAB1 se localise aux Cajal bodies, ce qui suggère que la protéine de fusion Halo-TCAB1 est fonctionnelle (Figure 22D). Ces résultats préliminaires montrent aussi quelques particules de Halo-TCAB1 localisées au nucléole, dont le suivi a été possible (<https://figshare.com/s/d03fb2c0abbbf2949e7f>), suggérant qu'elles transitent par ce compartiment.

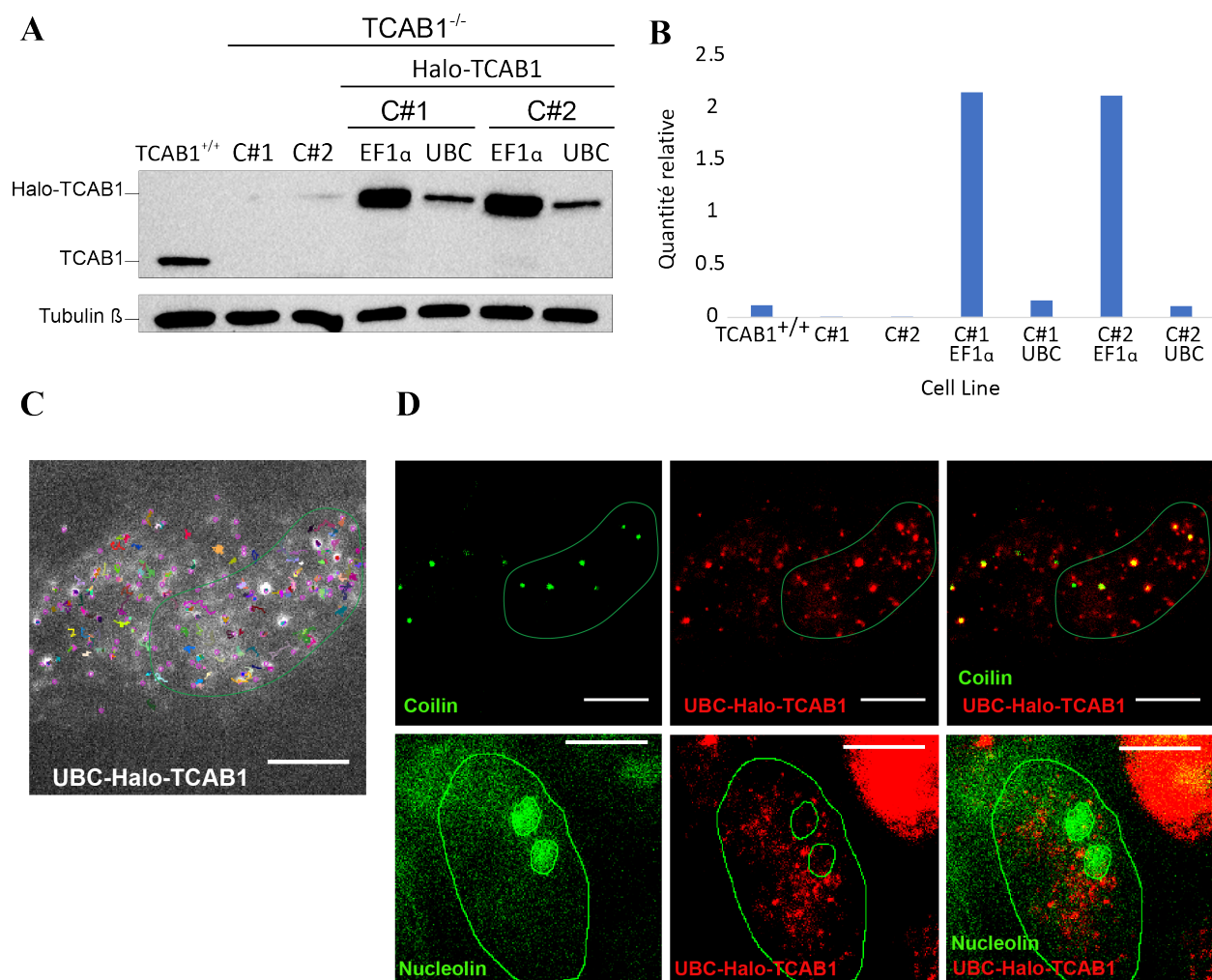


Figure 22: Validation de l'expression de la protéine Halo-TCAB1 exprimé avec un promoteur plus faible. (A) L'expression de la protéine Halo-TCAB1 avec un promoteur fort (EF1α) et un promoteur faible (UBC) a été validée par immunobuvardage de type Western dans les cellules HeLa 1.3 hTR-5'-3xMS2 TCAB1^{-/-}. Pour cela, un anticorps anti-TCAB1 a été utilisé suivi d'un anticorps anti-tubuline β pour contrôle de chargement. (B) Quantification de l'expression de la protéine Halo-TCAB1 exprimée à partir de différents promoteurs. La quantité de relative de TCAB1 a été déterminée par rapport à la bêta-tubuline. (C) Des particules de Halo-TCAB1 sont visibles et peuvent être suivies grâce à l'outil TrackMate du logiciel FIJI. Barre de l'échelle : 10µm. (D) Visualisation de la localisation de la protéine Halo-TCAB1 par imagerie au microscope super résolution en mode HiLo. Les cellules ont été colorées avec le fluorophore JaneliaFluor 646 (rouge). BFP-coilin et BFP-nucleolin ont été transfectés pour marquer

respectivement et de manière indépendante les Cajal bodies et le nucléole (vert). Barre de l'échelle : 10 μ m.

Chapitre 4 – Discussion

L'élongation des télomères par la télomérase est un processus clé dans la tumorigénèse étant donné que près de 90% des cancers présentent ce processus. L'activité de la télomérase est principalement déterminée par sa maturation ainsi que par son recrutement aux télomères, deux processus pendant lesquels elle interagit avec plusieurs effecteurs dont la coordination, bien qu'importante, demeure peu comprise. Aussi, bien que l'interactome de la télomérase soit de mieux en mieux caractérisé, la coordination spatio-temporelle de ces facteurs avec la télomérase demeure peu comprise. Il en va de même pour la dynamique des interactions qui, bien que centrale pour les processus biologiques, reste complexe à étudier et n'a été l'objet de peu d'étude jusqu'à maintenant. Afin de mieux caractériser ces processus, nous avons tiré profit de la puissance d'approche de microscopie en molécules uniques en temps réel pour étudier deux étapes importantes de la régulation de l'activité de la télomérase : l'implication la protéine TCAB1 dans la maturation de hTR aux Cajal bodies, ainsi que l'impact d'une mutation de POT1 sur la dynamique de liaison de la télomérase aux télomères.

Un programme de quantification qui facilite l'analyse d'image

Un aperçu de la fonction et de la régulation des molécules biologiques peut souvent être obtenu en déterminant avec quelles structures cellulaires et autres molécules elles colocalisent. Ainsi, l'utilisation de techniques de marquage suivi de microscopie est un bon moyen de comprendre les processus biologiques impliqués. Cependant, cela nécessite un bon nombre d'analyse de données qui peuvent vite être difficiles, laborieuses et non reproductibles (153). L'utilisation de logiciels évaluant la localisation ou colocalisation de molécules et permettant leur quantification est donc essentiel.

Les outils existant peuvent être divisés en deux catégories, soit les programmes d'analyse de colocalisation en cellule fixe (*e.g.* JACoP et EzColocalization (153,157)) et les programmes de suivi de particules (*e.g.* TrackMate (152)). Cependant, il n'existe, à notre connaissance, aucun outil permettant d'analyser la colocalisation de molécules uniques dans le temps, à partir de films. Dans le cadre d'une étude précédemment faite dans le laboratoire, le suivi des particules était donc

d'abord effectué avec l'outil TrackMate suivit d'une analyse manuelle de la colocalisation à partir de *tracks* TrackMate et d'images fixes des télomères (72). Cette analyse laborieuse nécessitait plus d'une heure par cellule, limitant fortement la capacité à effectuer de multiples analyses à grande échelle et de ce fait la puissance statistique des analyses. Afin de pallier cette problématique, le *pipeline* DCTracker (DualCam Tracker) a été développé pour automatiser l'analyse. Il s'agit d'un *pipeline* modulaire composé d'un ensemble de scripts qui permettent d'analyser les colocalisations de particules dans les données d'imagerie et d'en extraire l'information nécessaire à l'analyse des interactions entre les particules. Sa nature modulaire permet de modifier la suite d'étapes ou d'ajouter des étapes d'analyse afin de l'adapter aux différentes analyses à réaliser. Il inclut différentes étapes de pré-traitement, d'analyse de la colocalisation suivit de l'analyse des interactions. L'amélioration principale de l'analyse de données produite par le pipeline réside dans l'analyse de la colocalisation. Celle-ci a été développée de sorte à identifier la colocalisation spatiale de la même manière qu'un expert pourrait l'identifier manuellement. Pour ce faire, une colocalisation « *object-based* » (*i.e.* basée sur l'intersection entre les particules) est utilisée. Cette approche se distingue des analyses basées sur les pixels couramment utilisés par le fait qu'elle permet d'identifier chaque objet présent dans l'image et le suivi des objets dans le temps (160), ce qui n'est pas possible avec une approche par pixel. De plus, la colocalisation est déterminée selon la distance entre deux particules plutôt que par l'identification d'une superposition de signal, augmentant ainsi la flexibilité de l'analyse en permettant l'identification d'une colocalisation de particules sans que le signal soit parfaitement superposé (*e.g.* dû aux limitations technologiques lors de la visualisation de petite particules) (161). La présence d'une colocalisation réelle est alors validée en utilisant les informations de la composante temps.

Dans ce projet, l'utilisation de DCTracker a rendu possible l'analyse de colocalisation des particules entre deux films, ce qui nécessiterait trop de temps pour être effectuée manuellement. Cette amélioration permet d'augmenter la précision des analyses et permettra l'analyse de colocalisation entre des petites particules (*e.g.* TCAB1 et hTR), qui nécessite l'analyse de deux films. De plus, cette méthode permet une réduction importante du temps d'analyse des données en permettant l'analyse de chaque cellule en 2 à 3 minutes plutôt qu'environ une heure.

Pour valider le programme d'analyse, les données de colocalisation de l'ARN hTR avec les télomères dans des cellules exprimant POT1-WT ou POT1- Δ OB traitées manuellement et publiées dans la précédente étude faite au laboratoire (72) ont été reprises, traitées et analysées

automatiquement. Les résultats ont montré une très bonne reproductivité de l'analyse, certifiant ainsi le bon fonctionnement du programme DCTracker (Figure 16). Une expérience indépendante a par la suite été faite en utilisant le même mutant et les mêmes conditions que dans cette étude et les résultats obtenus en utilisant DCTracker ont montré une même différence entre le mutant POT1- Δ OB et le contrôle POT1-WT, confirmant encore une fois que cette méthode permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'analyse manuelle par un expert. Ceci suggère que l'algorithme de DCTracker permet de répliquer fidèlement la logique de cette analyse. Cependant, le programme *pipeline* DCTracker ne permet que d'identifier la colocalisation de particules dans le temps et ne considère aucun paramètre cinétique pouvant caractériser une interaction réelle. Il n'est donc pas certain qu'il y ait une interaction entre les particules qui colocalisent. Cette problématique a été mitigée en ajoutant un seuil minimum de 5 *timepoints* de colocalisation avant de considérer que deux molécules interagissent. Cependant, il serait intéressant que DCTracker prenne en considération des paramètres cinétiques afin d'éviter l'identification de fausses interactions. De plus, DCTracker ne peut être utilisé dans des situations où un nombre important de particules est présent dans une région car plusieurs fausses interactions risquent d'être identifiées en raison de la proximité des particules.

Localisation et biogénèse de hTR

Le processus de maturation de hTR s'effectue aux Cajal bodies et dans le nucléole, mais le trafic des particules entre ces composants, l'importance de ces étapes et les potentielles voies alternatives demeurent peu comprises. Une récente étude de notre laboratoire effectuée en cellules vivantes a confirmé que des particules de hTR sont observées dans différents compartiments cellulaires, à savoir, le nucléoplasme, les télomères, les CB et les nucléoles (72). Cependant, bien que cette étude ait confirmé la présence de molécules de hTR localisées dans les CB tel que décrit précédemment, environ 10% des particules de hTR observées étaient situées aux CB, remettant ainsi en question le modèle selon lequel hTR s'accumule aux CB pendant la majorité du cycle cellulaire (36,72,83,84). Cette différence pourrait être expliquée par le manque de sensibilité de l'analyse FISH classique et met de l'avant l'importance de l'analyse des particules uniques en cellules vivantes. De plus, la présence de molécules de hTR a aussi été observée dans le nucléole, ce qui est en adéquation avec des résultats précédemment observés, et suggère qu'une partie de la

maturation de hTR se passe dans ce compartiment (162). Cependant, il n'y a pas de consensus quant au déroulement des étapes impliquées dans la maturation de la télomérase avant son recrutement aux télomères. La localisation de hTR au CB est favorisée par TCAB1 et des mutations dans cette protéine engendreraient une accumulation de hTR aux nucléoles (41,52,163). Il est donc tout naturel de penser qu'une potentielle voie de maturation de hTR serait son transport du nucléole vers les CB grâce à TCAB1, cependant l'existence d'une telle voie reste à démontrer.

Afin d'étudier le trafic nucléaire de hTR par TCAB1, le développement d'une méthode permettant de visualiser à la fois hTR et TCAB1 en temps réel est nécessaire. Pour ce faire, nous avons marqué la protéine TCAB1 avec un HaloTag. Afin de permettre sa visualisation, le HaloTag est lié de manière covalente à JaneliaFluor 646, un fluorophore organique avec une intensité de fluorescence forte et assez résistant au photoblanchiment, ce qui en fait un candidat idéal pour l'imagerie de molécule unique en cellule vivantes. L'utilisation de ce système, nous a permis d'observer des particules uniques de TCAB1 dans les cellules humaines vivantes. Nos résultats préliminaires ont aussi montré que la protéine de fusion Halo-TCAB1 se retrouvait aux Cajal bodies (Figure 21C), validant sa localisation et partiellement sa fonctionnalité. Cependant, il sera aussi nécessaire de valider quelques interactions qui ont lieu avec d'autres protéines (*e.g.* dyskerine, coilin, NHP2) pour vérifier si le HaloTag interfère ou non avec la fonction de TCAB1 avant d'utiliser cette construction pour étudier la dynamique de TCAB1.

La première construction de la protéine Halo-TCAB1 possédait un promoteur fort ($EF1\alpha$), et il a été difficile, voire impossible à imager des molécules uniques (données non présentées). Afin de pallier cette limitation, une seconde version de la construction a été faite avec un promoteur plus faible (UBC), permettant même de l'exprimer à un niveau similaire à l'endogène (Figure 22A-B). Cette dernière construction permet le suivi de particules unique de Halo-TCAB1 (Figure 22C), validant ainsi l'utilisation des lignées cellulaires construites pour l'étude du trafic de hTR par TCAB1. Cependant, l'utilisation d'un microscope haute résolution utilisant la technologie HiLo a été essentielle afin d'avoir des conditions d'imagerie optimales, c'est-à-dire ayant un rapport signal/bruit élevé et un faible bruit de fond, permettant ainsi une bonne imagerie de molécules uniques (164). Il aurait cependant été préférable d'utiliser le microscope à *spinning disk* (Zeiss *Spinning Disk*; Plateforme de microscopie photonique, Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal) puisqu'elle possède la capacité d'imager en *Dual camera* et que l'imagerie de hTR a été optimisée sur cette plateforme. Les essais actuels ont cependant été

inconcluant sur ce microscope et n'ont pas permis la détection des molécules uniques de Halo-TCAB1. Ceci pourrait potentiellement être dû au faible signal de Halo-TCAB1. En effet, puisqu'une seule molécule fluorescente se lie par protéine, la fluorescence est quasi-équivalente au bruit de fond et rend ainsi la détection plus difficile en utilisant ce microscope.

Des résultats préliminaires obtenus dans cette étude ont montré que Halo-TCAB1 se localisait aux Cajal bodies (Figure 22D), ce qui est en accord avec la littérature. De plus dans les quelques premiers films observés, il semble que Halo-TCAB1 se retrouve aussi dans le nucléole (Figure 22D). Cependant, étant des résultats préliminaires qui ont permis de mettre au point l'expérience et de définir les conditions d'imagerie, il faudrait effectuer l'expérience en intégrant des contrôles et des répliques afin de pouvoir se prononcer. Ainsi, en évaluant la dynamique de TCAB1 dans les différents compartiments mais aussi en évaluant sa colocalisation avec hTR, nous pourrions mieux définir une partie des différentes étapes impliquées dans la maturation de la télomérase. Ultimement, il serait intéressant, après la validation de la protéine Halo-TCAB1, de l'incorporer directement dans le génome des cellules à l'étude avec CRISPR/Cas9 pour pouvoir faire l'étude dans des conditions endogènes.

La surexpression de hTERT facilite l'étude du recrutement de hTR aux télomères

Afin d'avoir un nombre suffisant de molécules de télomérases et ainsi de mieux caractériser son recrutement aux télomères, la protéine hTERT a été surexprimée. Des résultats précédemment publiés ont montré que la surexpression de la sous-unité hTERT permettait d'augmenter la quantité de complexe hTR-hTERT et d'augmenter les événements d'association de la télomérase aux télomères (72). Nous avons quand même essayé de quantifier le signal dans des cellules exprimant hTERT endogène, mais il a été difficile d'imager des molécules uniques puisque celles-ci étaient peu fluorescentes. À cause d'une limitation technique, notamment les lasers du microscope utilisé dont la puissance n'était pas assez élevée, il a été difficile de faire le suivi des molécules uniques de hTR libres (Figure 18A), empêchant ainsi une bonne détection de ces événements (Figure 18B). Il serait tout de même intéressant de pouvoir entreprendre cette expérience dans des conditions hTERT endogènes, possiblement en augmentant la durée d'acquisition de nos films pour détecter ces événements de colocalisation.

POT1 régule le recrutement de la télomérase aux télomères

De récentes études ont identifié plusieurs mutations dans les domaines OB-fold en N-terminus de POT1 associées à différents cancers dans lesquels la longueur des télomères est augmentée (100,101,105,110,165). Une étude précédente faite au laboratoire a montré que l'expression de POT1- Δ OB augmentait l'accès et le temps de résidence de la télomérase aux télomères (72). Un phénotype similaire est retrouvé chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique qui présentent la mutation ponctuelle POT1 K90E. Nous pensons donc que le phénotype quant au recrutement de la télomérase aux télomères est similaire chez les mutants POT1- Δ OB et POT1 K90E.

La protéine POT1 lie et séquestre l'extrémité simple brin des télomères, prévenant le recrutement de la télomérase aux télomères par la compétition entre POT1 et hTR pour l'extrémité simple brin du télomère (94). Ainsi, plusieurs mutants dans les domaines OB-fold de POT1 ont une faible affinité pour lier l'ADN simple brin *in vitro*, ce qui diminuerait la capacité de POT1 à compétitionner avec la télomérase. Cependant, POT1 et TPP1 stimulent aussi la processivité de la télomérase, et certaines mutations dans POT1 pourraient augmenter cette activité (46,93). Dans les deux cas, ces mutations favorisent un allongement des télomères (166). Pour distinguer entre ces deux mécanismes d'action potentiels pour les mutants de POT1, il est important de pouvoir déterminer l'impact de ces mutants sur l'accès de la télomérase aux télomères. La liaison de POT1 à l'extrémité simple brin du télomère s'effectue via ses domaines OB-fold et nous avons observé que le mutant Δ OB augmente l'accès du télomère pour la télomérase, ce qui expliquerait l'augmentation de la fréquence où les télomères sont visités par la télomérase (72). Étonnement, le mutant ponctuel K90E présente un phénotype similaire au mutant Δ OB, ce qui suggère que la lysine 90 joue un rôle clé dans la prévention de l'accès de l'extrémité simple brin par la télomérase (Figure 19A,20A). Cependant, une étude structurale de la liaison de POT1 à l'ADN simple brin suggère que la lysine 90 dans le domaine OB1 n'interagit pas directement avec l'ADN (114). De plus, il a été démontré que le mutant POT1 K90E n'affecte pas la liaison de POT1 à l'ADN simple brin *in vitro* (114). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que la différence d'accessibilité de l'extrémité simple brin des télomères observée chez le mutant POT1 K90E n'est pas imputable à une diminution de son interaction avec l'ADN simple brin.

Il est possible que la différence dans la séquestration de l'extrémité simple brin soit due à la présence de modification post-traductionnelles sur la lysine 90. En effet, il a été suggéré que la lysine 90 de POT1 pourrait être sujette à la SUMOylation par SUMO1 (167), sans que l'existence de cette modification *in vivo* n'ait été confirmée. De plus, chez la levure la SUMOylation de Tpz1 (homologue de TPP1) est impliquée dans la régulation de la longueur des télomères par la modulation du recrutement de Stn1-Ten1 (des sous-unités du complexe CST) aux télomères (168). Puisque chez l'humain l'assemblage de CST au niveau de la shelterin est médiée par POT1 (140), il serait possible qu'un mécanisme similaire existe. Ainsi, un potentiel mécanisme de régulation de l'accessibilité à l'extrémité simple brin par SUMOylation pourrait impliquer un encombrement stérique par la protéine SUMO sur POT1 qui viendrait renforcer la séquestration de l'extension 3' simple brin, empêchant ainsi le recrutement de la télomérase aux télomères. La mutation ponctuelle K90E enlèverait un potentiel site de SUMOylation, rendant donc l'extrémité simple brin des télomères plus accessibles à la télomérase. Évidemment, puisque la SUMOylation est un processus réversible et hautement dynamique (168), chez les cellules ayant besoin d'exprimer la télomérase, comme les cellules souches, cette inhibition pourrait être levée pour permettre l'accès par la télomérase.

La longueur des télomères étant défini par deux facteurs, l'accessibilité à l'ADN télomérique et le degré d'élongation par la télomérase (169), une plus grande accessibilité des télomères à la télomérase n'explique pas nécessairement à elle seule l'augmentation de la longueur des télomères chez les patients présentant la mutation POT1 K90E. Afin d'évaluer si cette mutation affecte aussi le degré d'élongation des télomères, le temps de résidence de la télomérase aux télomères (*i.e.* la durée d'élongation des télomères), a aussi été évalué. Nous avons observé que l'élongation est plus longue chez les mutants POT1 K90E et POT1- Δ OB que chez le POT1 sauvage (Figure 20B), ce qui suggère que, une fois la télomérase recrutée sur les télomères, celle-ci y reste plus longtemps. En temps normal, le complexe CST permet d'inhiber l'extension télomérique en limitant l'accès de la télomérase aux télomères et en inhibant l'interaction entre TPP1-POT1 et la télomérase, ce qui permettrait de terminer la réplication des télomères et limite ainsi l'élongation des télomères (140). De plus, il a déjà été démontré que, bien que la mutation POT1 K90E n'affecte pas directement la liaison de TPP1-POT1 au complexe CST, elle perturbe l'assemblage du complexe CST compromettant ainsi sa fonction (114). De même, l'augmentation du temps d'interaction entre la télomérase et les télomères suggère une perte de ce mécanisme

causée par la mutation K90E et porte à croire que le complexe CST ne pourrait plus intervenir pour terminer la réplication. Ainsi, de futures expériences biochimiques et structurales seraient à faire afin de mieux définir la dynamique entre TPP1-POT1 et CST aux télomères. D'ailleurs, de récentes études ont révélé qu'il existait une interaction entre hTERT et POT1 au niveau des acides aminés D224 et N225 (93). De plus, le mutant POT1 D224N a été identifié chez des patients atteints de mélanome cutané malin (101), mais aucune étude sur l'impact de ce mutant quant au recrutement de la télomérase au télomère n'a été faite. Ainsi, sachant que c'est une mutation qui se retrouve à l'interface d'interaction de POT1-TERT nouvellement identifiée, il serait intéressant d'utiliser notre approche d'imagerie en molécule unique pour caractériser ce mutant.

Conclusion

La biogénèse de la télomérase ainsi que son recrutement aux télomères sont des processus dynamiques qui sont finement et hautement régulés. Cependant, l'impact de cette régulation sur la dynamique de la télomérase est encore peu compris malgré les nombreuses études effectuées ce sujet. Ainsi, l'utilisation de méthodes permettant le suivi de particules uniques en microscopie en temps réel permet de mieux comprendre le dynamisme des mécanismes impliqués.

Dans ce projet, nous avons d'abord mis au point un programme d'analyse de colocalisation, DCTracker, très versatile qui nous a permis d'automatiser les analyses initialement faites manuellement. Le bon fonctionnement de DCTracker a été validé en utilisant des données précédemment publiées, ce qui a été concluant.

Aussi, nous avons montré que le mutant ponctuel POT1 K90E, retrouvé chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et qui présentent une élongation anormale des télomères, impliquait une augmentation du recrutement de la télomérase aux télomères et de sa durée au même titre qu'un mutant ayant une délétion du domaine OB-fold. Les expériences étant faites dans des conditions de surexpression de hTERT, il serait intéressant d'introduire dans le génome les mutations et d'entreprendre les expériences dans des conditions endogènes pour mieux définir leur impact. Enfin, nous avons aussi adapté la technologie HaloTag pour le suivi de molécules uniques de TCAB1, protéine impliquée dans une étape de la maturation de la télomérase. Les résultats préliminaires ont montré que l'utilisation du construit est prometteur vu qu'il permet le suivi de particules uniques, d'autant plus que nous avons pu valider sa localisation dans les CB. Aussi, les

résultats préliminaires ont montré que des molécules uniques de TCAB1 se retrouvaient dans le nucléole. Des expériences en condition endogène seraient aussi intéressantes à effectuer afin de mieux cibler la biogénèse de la télomérase.

Enfin, compte tenu du fait que la télomérase est impliquée dans la plupart des cancers mais aussi dans plusieurs téloméropathies, les études qui mènent à comprendre la dynamique d'action du recrutement de la télomérase aux télomères se voient être importantes pour améliorer la compréhension de ces pathologies. De plus, en raison de la nature dynamique et l'importance de la localisation spatio-temporelle de l'ensemble des facteurs impliqués dans la régulation de l'activité de la télomérase sur celle-ci, l'étude de la dynamique de ces interactions est essentielle pour permettre une bonne compréhension du mécanisme par lequel les mutations causant ces pathologies affectent l'élongation des télomères. Ainsi, les outils développés dans ce projet, combinés à ceux du laboratoire, permettront d'identifier plus précisément l'impact d'une mutation sur la localisation et les interactions de la télomérase au cours de sa maturation et de son trafic ainsi que sur la régulation de l'activité au niveau des télomères. À la suite de ce projet, la construction d'autres lignées cellulaires exprimant des protéines de fusion fluorescentes de l'interactome de la télomérase permettrait d'améliorer la compréhension du mécanisme exact par lequel un mutant affecte le fonctionnement de ce complexe. De plus, ce système pourra permettre de comprendre le mécanisme d'autres mutants de protéines de l'interactome de la télomérase impliquées dans les cancers ou les téloméropathies afin de faciliter le développement de thérapies ou encore de trouver de nouvelles cibles pour des traitements.

Références

1. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of Telomerase Activity in Human Cancer. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2011 May;110(5):275–89.
2. Pickett HA, Reddel RR. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Nov;22(11):875–80.
3. Greider CW. Telomeres. *Current Opinion in Cell Biology*. 1991 Jun;3(3):444–51.
4. Roake CM, Artandi SE. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):384–97.
5. Schmidt JC, Cech TR. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev*. 2015 Jun 1;29(11):1095–105.
6. Barnett MA, Buckle VJ, Evans EP, Porter ACG, Rout D, Smith AG, et al. Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucl Acids Res*. 1993;21(1):27–36.
7. Hanish JP, Yanowitz JL, de Lange T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Sep 13;91(19):8861–5.
8. McElligott R. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *The EMBO Journal*. 1997 Jun 15;16(12):3705–14.
9. Palm W, de Lange T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008 Dec;42(1):301–34.
10. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*. 1999 May;97(4):503–14.
11. Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jun;17(6):364–78.
12. Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep*. 2005 Jan;6(1):39–45.
13. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*. 2005 Sep 15;19(18):2100–10.
14. Ye JZS, Donigian JR, van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, et al. TIN2 Binds TRF1 and TRF2 Simultaneously and Stabilizes the TRF2 Complex on Telomeres. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):47264–71.

15. Kim S ho, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. TIN2 Mediates Functions of TRF2 at Human Telomeres. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43799–804.
16. Frescas D, de Lange T. Binding of TPP1 Protein to TIN2 Protein Is Required for POT1a,b Protein-mediated Telomere Protection. *J Biol Chem*. 2014 Aug 29;289(35):24180–7.
17. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JHJ, et al. The Telomeric Protein TRF2 Binds the ATM Kinase and Can Inhibit the ATM-Dependent DNA Damage Response. Steve Elledge, editor. *PLoS Biol*. 2004 Aug 17;2(8):e240.
18. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*. 2007 Aug;448(7157):1068–71.
19. Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021 Feb 9 [cited 2021 Mar 9]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41580-021-00328-y>
20. Lingner J, Cooper J, Cech T. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science*. 1995 Sep 15;269(5230):1533–4.
21. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. 1 p.
22. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961 Dec;25(3):585–621.
23. Wellinger RJ. In the End, What’s the Problem? *Molecular Cell*. 2014 Mar;53(6):855–6.
24. Bodnar AG. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):349–52.
25. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985 Dec;43(2):405–13.
26. Nguyen THD, Tam J, Wu RA, Greber BJ, Toso D, Nogales E, et al. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature*. 2018 May;557(7704):190–5.
27. Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary Structure of Vertebrate Telomerase RNA. *Cell*. 2000 Mar;100(5):503–14.
28. Chen L, Roake CM, Galati A, Bavasso F, Micheli E, Saggio I, et al. Loss of Human TGS1 Hypermethylase Promotes Increased Telomerase RNA and Telomere Elongation. *Cell Reports*. 2020 Feb;30(5):1358-1372.e5.
29. Theimer CA, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA. *Current Opinion in Structural Biology*. 2006 Jun;16(3):307–18.

30. Zhang Q, Kim NK, Feigon J. Architecture of human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Dec 20;108(51):20325–32.
31. Xie M, Mosig A, Qi X, Li Y, Stadler PF, Chen JLL. Structure and Function of the Smallest Vertebrate Telomerase RNA from Teleost Fish. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Jan;283(4):2049–59.
32. Ly H, Blackburn EH, Parslow TG. Comprehensive Structure-Function Analysis of the Core Domain of Human Telomerase RNA. *Mol Cell Biol*. 2003 Oct;23(19):6849–56.
33. Chen JL. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Research*. 2002 Jan 15;30(2):592–7.
34. Mitchell JR, Collins K. Human Telomerase Activation Requires Two Independent Interactions between Telomerase RNA and Telomerase Reverse Transcriptase. *Molecular Cell*. 2000 Aug;6(2):361–71.
35. Autexier C, Pruzan R, Funk WD, Greider CW. Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J*. 1996 Nov 1;15(21):5928–35.
36. Jády BE, Bertrand E, Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body–specific localization signal. *Journal of Cell Biology*. 2004 Mar 1;164(5):647–52.
37. Fu D, Collins K. Distinct Biogenesis Pathways for Human Telomerase RNA and H/ACA Small Nucleolar RNAs. *Molecular Cell*. 2003 May;11(5):1361–72.
38. Theimer CA, Jády BE, Chim N, Richard P, Breece KE, Kiss T, et al. Structural and Functional Characterization of Human Telomerase RNA Processing and Cajal Body Localization Signals. *Molecular Cell*. 2007 Sep;27(6):869–81.
39. Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jády BE. Box H/ACA Small Ribonucleoproteins. *Molecular Cell*. 2010 Mar;37(5):597–606.
40. Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA. A Conserved WD40 Protein Binds the Cajal Body Localization Signal of scaRNP Particles. *Molecular Cell*. 2009 Apr;34(1):47–57.
41. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis. *Science*. 2009 Jan 30;323(5914):644–8.
42. Egan ED, Collins K. Specificity and Stoichiometry of Subunit Interactions in the Human Telomerase Holoenzyme Assembled *In Vivo*. *Mol Cell Biol*. 2010 Jun;30(11):2775–86.
43. Ghanim GE, Fountain AJ, van Roon AMM, Rangan R, Das R, Collins K, et al. Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. *Nature*. 2021 May 20;593(7859):449–53.

44. Smith EM, Pendlebury DF, Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Jan;77(1):61–79.
45. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci.* 2018 Dec;25(1):22.
46. Liu B, He Y, Wang Y, Song H, Zhou ZH, Feigon J. Structure of active human telomerase with telomere shelterin protein TPP1. *Nature.* 2022 Apr 21;604(7906):578–83.
47. Jiang J, Wang Y, Sušac L, Chan H, Basu R, Zhou ZH, et al. Structure of Telomerase with Telomeric DNA. *Cell.* 2018 May;173(5):1179-1190.e13.
48. Schmidt JC, Dalby AB, Cech TR. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *eLife.* 2014 Oct 1;3:e03563.
49. MacNeil D, Bensoussan H, Autexier C. Telomerase Regulation from Beginning to the End. *Genes.* 2016 Sep 14;7(9):64.
50. Chen L, Roake CM, Freund A, Batista PJ, Tian S, Yin YA, et al. An Activity Switch in Human Telomerase Based on RNA Conformation and Shaped by TCAB1. *Cell.* 2018 Jun;174(1):218-230.e13.
51. Mahmoudi S, Henriksson S, Weibrecht I, Smith S, Söderberg O, Strömblad S, et al. WRAP53 Is Essential for Cajal Body Formation and for Targeting the Survival of Motor Neuron Complex to Cajal Bodies. Misteli T, editor. *PLoS Biol.* 2010 Nov 2;8(11):e1000521.
52. Freund A, Zhong FL, Venteicher AS, Meng Z, Veenstra TD, Frydman J, et al. Proteostatic Control of Telomerase Function through TRiC-Mediated Folding of TCAB1. *Cell.* 2014 Dec;159(6):1389–403.
53. Stern JL, Zyner KG, Pickett HA, Cohen SB, Bryan TM. Telomerase Recruitment Requires both TCAB1 and Cajal Bodies Independently. *Molecular and Cellular Biology.* 2012 Jul 1;32(13):2384–95.
54. Zhong FL, Batista LFZ, Freund A, Pech MF, Venteicher AS, Artandi SE. TPP1 OB-Fold Domain Controls Telomere Maintenance by Recruiting Telomerase to Chromosome Ends. *Cell.* 2012 Aug;150(3):481–94.
55. Darzacq X, Kittur N, Roy S, Shav-Tal Y, Singer RH, Meier UT. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *Journal of Cell Biology.* 2006 Apr 24;173(2):207–18.
56. McMahon M, Contreras A, Ruggero D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease: H/ACA snoRNAs: Small RNAs with big implications. *WIREs RNA.* 2015 Mar;6(2):173–89.

57. Penzo M, Montanaro L. Turning Uridines around: Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function. *Biomolecules*. 2018 Jun 5;8(2):38.
58. Kim NK, Theimer CA, Mitchell JR, Collins K, Feigon J. Effect of pseudouridylation on the structure and activity of the catalytically essential P6.1 hairpin in human telomerase RNA. *Nucleic Acids Research*. 2010 Oct;38(19):6746–56.
59. Shukla S, Schmidt JC, Goldfarb KC, Cech TR, Parker R. Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Apr;23(4):286–92.
60. Palka C, Forino NM, Hentschel J, Das R, Stone MD. Folding heterogeneity in the essential human telomerase RNA three-way junction. *RNA*. 2020 Dec;26(12):1787–800.
61. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):9–18.
62. Feng J, Funk W, Wang S, Weinrich S, Avilion A, Chiu C, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1236–41.
63. Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. Functional Characterization and Developmental Regulation of Mouse Telomerase RNA. *Science*. 1995 Sep;269(5228):1267–70.
64. Bilsland AE, Stevenson K, Atkinson S, Kolch W, Keith WN. Transcriptional repression of telomerase RNA gene expression by c-Jun-NH2-kinase and Sp1/Sp3. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1363–70.
65. Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*. 2008 Jan;90(1):13–23.
66. Rubtsova MP, Vasilkova DP, Moshareva MA, Malyavko AN, Meerson MB, Zatsepin TS, et al. Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis. *Sci Rep*. 2019 Feb 8;9(1):1701.
67. Davidson L, Francis L, Eaton JD, West S. Integrator-Dependent and Allosteric/Intrinsic Mechanisms Ensure Efficient Termination of snRNA Transcription. *Cell Rep*. 2020 Oct 27;33(4):108319.
68. Roake CM, Chen L, Chakravarthy AL, Ferrell JE, Raffa GD, Artandi SE. Disruption of Telomerase RNA Maturation Kinetics Precipitates Disease. *Molecular Cell*. 2019 May;74(4):688-700.e3.
69. Leulliot N, Godin KS, Hoareau-Aveilla C, Quevillon-Cheruel S, Varani G, Henry Y, et al. The Box H/ACA RNP Assembly Factor Naf1p Contains a Domain Homologous to Gar1p Mediating its Interaction with Cbf5p. *Journal of Molecular Biology*. 2007 Aug;371(5):1338–53.

70. Goldfarb KC, Cech TR. 3' terminal diversity of MRP RNA and other human noncoding RNAs revealed by deep sequencing. *BMC Mol Biol.* 2013;14(1):23.
71. Qin J, Autexier C. Regulation of human telomerase RNA biogenesis and localization. *RNA Biology.* 2021 Mar 4;18(3):305–15.
72. Laprade H, Querido E, Smith MJ, Guérit D, Crimmins H, Conomos D, et al. Single-Molecule Imaging of Telomerase RNA Reveals a Recruitment-Retention Model for Telomere Elongation. *Molecular Cell.* 2020 Jul;79(1):115-126.e6.
73. Moon DH, Segal M, Boyraz B, Guinan E, Hofmann I, Cahan P, et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet.* 2015 Dec;47(12):1482–8.
74. Tseng CK, Wang HF, Burns AM, Schroeder MR, Gaspari M, Baumann P. Human Telomerase RNA Processing and Quality Control. *Cell Reports.* 2015 Dec;13(10):2232–43.
75. Lardelli RM, Schaffer AE, Eggens VRC, Zaki MS, Grainger S, Sathe S, et al. Biallelic mutations in the 3' exonuclease TOE1 cause pontocerebellar hypoplasia and uncover a role in snRNA processing. *Nat Genet.* 2017 Mar;49(3):457–64.
76. Son A, Park JE, Kim VN. PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs. *Cell Reports.* 2018 Apr;23(3):888–98.
77. Deng T, Huang Y, Weng K, Lin S, Li Y, Shi G, et al. TOE1 acts as a 3' exonuclease for telomerase RNA and regulates telomere maintenance. *Nucleic Acids Research.* 2019 Jan 10;47(1):391–405.
78. Meier UT. RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biology.* 2017 Jun 3;14(6):693–700.
79. Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, et al. Human Telomerase RNA Accumulation in Cajal Bodies Facilitates Telomerase Recruitment to Telomeres and Telomere Elongation. *Molecular Cell.* 2007 Sep;27(6):882–9.
80. Machyna M, Neugebauer KM, Staněk D. Coilin: The first 25 years. *RNA Biology.* 2015 Jun 3;12(6):590–6.
81. Jány BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. Cell Cycle-dependent Recruitment of Telomerase RNA and Cajal Bodies to Human Telomeres. *MBoC.* 2006 Feb;17(2):944–54.
82. Al-Masraf BS, Perez GI, Adams-Boone K, Cohen SB, Han L, Yu K, et al. TCAB1 prevents nucleolar accumulation of the telomerase RNA to promote telomerase assembly [Internet]. *Cell Biology*; 2021 May [cited 2022 Jun 9]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.05.27.445986>
83. Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP. Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells. *MBoC.* 2004 Jan;15(1):81–90.

84. Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell Cycle-regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres. *MBoC*. 2006 Feb;17(2):955–65.
85. Chen Y, Deng Z, Jiang S, Hu Q, Liu H, Songyang Z, et al. Human cells lacking coilin and Cajal bodies are proficient in telomerase assembly, trafficking and telomere maintenance. *Nucleic Acids Research*. 2015 Jan 9;43(1):385–95.
86. Lee JH, Lee YS, Jeong SA, Khadka P, Roth J, Chung IK. Catalytically active telomerase holoenzyme is assembled in the dense fibrillar component of the nucleolus during S phase. *Histochem Cell Biol*. 2014 Feb;141(2):137–52.
87. Wong JMY, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;4(9):731–6.
88. Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A Dynamic Molecular Link between the Telomere Length Regulator TRF1 and the Chromosome End Protector TRF2. *Current Biology*. 2004 Sep;14(18):1621–31.
89. Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, Qin J, et al. PTP1B interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol*. 2004 Jul;6(7):673–80.
90. Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- β and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*. 2007 Feb;445(7127):559–62.
91. Abreu E, Artonovska E, Reichenbach P, Cristofari G, Culp B, Terns RM, et al. TIN2-Tethered TPP1 Recruits Human Telomerase to Telomeres In Vivo. *MCB*. 2010 Jun 15;30(12):2971–82.
92. Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature*. 2012 Dec;492(7428):285–9.
93. Sekne Z, Ghanim GE, van Roon AMM, Nguyen THD. Structural basis of human telomerase recruitment by TPP1-POT1. *Science*. 2022 Mar 11;375(6585):1173–6.
94. Aramburu T, Plucinsky S, Skordalakes E. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020;18:1939–46.
95. Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Dec;11(12):1223–9.
96. Loayza D, Parsons H, Donigian J, Hoke K, de Lange T. DNA Binding Features of Human POT1: A NONAMER 5'-TAGGGTTAG-3' MINIMAL BINDING SITE, SEQUENCE SPECIFICITY, AND INTERNAL BINDING TO MULTIMERIC SITES. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):13241–8.

97. Rice C, Shastrula PK, Kossenkov AV, Hills R, Baird DM, Showe LC, et al. Structural and functional analysis of the human POT1-TPP1 telomeric complex. *Nat Commun.* 2017 Apr;8(1):14928.
98. Loayza D, de Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature.* 2003 Jun;423(6943):1013–8.
99. Calvete O, Garcia-Pavia P, Domínguez F, Bougeard G, Kunze K, Braeuning A, et al. The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet.* 2017 Nov;25(11):1278–81.
100. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, Martínez-Trillos A, Villamor N, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013 May;45(5):526–30.
101. Shi J, Yang XR, NCI DCEG Cancer Sequencing Working Group, NCI DCEG Cancer Genomics Research Laboratory, French Familial Melanoma Study Group, Ballew B, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):482–6.
102. de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 1990 Feb;10(2):518–27.
103. Savage SA. Beginning at the ends: telomeres and human disease. *F1000Res.* 2018 May 1;7:524.
104. Aviv A, Anderson JJ, Shay JW. Mutations, Cancer and the Telomere Length Paradox. *Trends in Cancer.* 2017 Apr;3(4):253–8.
105. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, Aoude LG, Quesada V, Ding Z, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):478–81.
106. Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, Bertuch AA, Jhangiani SN, Doddapaneni H, et al. Germline Mutations in Shelterin Complex Genes Are Associated With Familial Glioma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute [Internet].* 2015 Jan [cited 2022 Jul 1];107(1). Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dju384>
107. Calvete O, Martinez P, Garcia-Pavia P, Benitez-Buelga C, Paumard-Hernández B, Fernandez V, et al. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li–Fraumeni-like families. *Nat Commun.* 2015 Dec;6(1):8383.
108. Speedy HE, Kinnersley B, Chubb D, Broderick P, Law PJ, Litchfield K, et al. Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016 Nov 10;128(19):2319–26.

109. Wilson TLS, Hattangady N, Lerario AM, Williams C, Koeppe E, Quinonez S, et al. A new POT1 germline mutation—expanding the spectrum of POT1-associated cancers. *Familial Cancer*. 2017 Oct;16(4):561–6.
110. McMaster ML, Sun C, Landi MT, Savage SA, Rotunno M, Yang XR, et al. Germline mutations in *Protection of Telomeres 1* in two families with Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2018 May;181(3):372–7.
111. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet*. 2018 Nov 23;52(1):223–47.
112. Gong Y, Stock AJ, Liu Y. The enigma of excessively long telomeres in cancer: lessons learned from rare human POT1 variants. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2020 Feb;60:48–55.
113. Murzin AG. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *The EMBO Journal*. 1993 Mar;12(3):861–7.
114. Pinzaru AM, Hom RA, Beal A, Phillips AF, Ni E, Cardozo T, et al. Telomere Replication Stress Induced by POT1 Inactivation Accelerates Tumorigenesis. *Cell Reports*. 2016 Jun;15(10):2170–84.
115. Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, et al. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*. 2007 Feb;445(7127):506–10.
116. Zaug AJ, Podell ER, Nandakumar J, Cech TR. Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. *Genes & Development*. 2010 Mar 15;24(6):613–22.
117. Akiyama BM, Parks JW, Stone MD. The telomerase essential N-terminal domain promotes DNA synthesis by stabilizing short RNA-DNA hybrids. *Nucleic Acids Research*. 2015 Jun 23;43(11):5537–49.
118. Eckert B, Collins K. Roles of Telomerase Reverse Transcriptase N-terminal Domain in Assembly and Activity of Tetrahymena Telomerase Holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Apr;287(16):12805–14.
119. Jacobs SA, Podell ER, Cech TR. Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Mar 1;13(3):218–25.
120. Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. Mutation in TERT separates processivity from anchor-site function. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Aug;15(8):870–2.
121. Chu TW, D’Souza Y, Autexier C. The Insertion in Fingers Domain in Human Telomerase Can Mediate Enzyme Processivity and Telomerase Recruitment to Telomeres in a TPP1-Dependent Manner. *Mol Cell Biol*. 2016 Jan;36(1):210–22.

122. Frank AK, Tran DC, Qu RW, Stohr BA, Segal DJ, Xu L. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. Zhou JQ, editor. *PLoS Genet.* 2015 Jul 31;11(7):e1005410.
123. Yang D, He Q, Kim H, Ma W, Songyang Z. TIN2 Protein Dyskeratosis Congenita Missense Mutants Are Defective in Association with Telomerase. *J Biol Chem.* 2011 Jul 1;286(26):23022–30.
124. Pike AM, Strong MA, Ouyang JPT, Greider CW. TIN2 Functions with TPP1/POT1 To Stimulate Telomerase Processivity. *Mol Cell Biol.* 2019 Aug 5;39(21):e00593-18, /mcb/39/21/MCB.00593-18.atom.
125. Banin S. Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1674–7.
126. Canman CE. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1677–9.
127. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004 Jun;73(1):39–85.
128. Lee SS, Bohrson C, Pike AM, Wheelan SJ, Greider CW. ATM Kinase Is Required for Telomere Elongation in Mouse and Human Cells. *Cell Reports.* 2015 Nov;13(8):1623–32.
129. Tong AS, Stern JL, Sfeir A, Kartawinata M, de Lange T, Zhu XD, et al. ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. *Cell Reports.* 2015 Nov;13(8):1633–46.
130. Wu Y, Xiao S, Zhu XD. MRE11–RAD50–NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Sep;14(9):832–40.
131. Porreca RM, Glousker G, Awad A, Matilla Fernandez MI, Gibaud A, Naucke C, et al. Human RTEL1 stabilizes long G-overhangs allowing telomerase-dependent over-extension. *Nucleic Acids Research.* 2018 May 18;46(9):4533–45.
132. Barber LJ, Youds JL, Ward JD, McIlwraith MJ, O’Neil NJ, Petalcorin MIR, et al. RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell.* 2008 Oct;135(2):261–71.
133. Sarek G, Vannier JB, Panier S, Petrini JHJ, Boulton SJ. TRF2 Recruits RTEL1 to Telomeres in S Phase to Promote T-Loop Unwinding. *Molecular Cell.* 2015 Feb;57(4):622–35.
134. Schmutz I, de Lange T. Shelterin. *Current Biology.* 2016 May;26(10):R397–9.

135. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar 1;20(5):1659–68.
136. Doksani Y, Wu JY, de Lange T, Zhuang X. Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-loop Formation. *Cell*. 2013 Oct;155(2):345–56.
137. Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Reports*. 2017 Jan;18(1):41–53.
138. Li B, de Lange T. Rap1 Affects the Length and Heterogeneity of Human Telomeres. *MBoC*. 2003 Dec;14(12):5060–8.
139. Wellinger RJ. The CST Complex and Telomere Maintenance: The Exception Becomes the Rule. *Molecular Cell*. 2009 Oct;36(2):168–9.
140. Chen LY, Redon S, Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature*. 2012 Aug;488(7412):540–4.
141. Casteel DE, Zhuang S, Zeng Y, Perrino FW, Boss GR, Goulian M, et al. A DNA Polymerase- α ·Primase Cofactor with Homology to Replication Protein A-32 Regulates DNA Replication in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 2009 Feb 27;284(9):5807–18.
142. Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, et al. Live Cell Imaging of Telomerase RNA Dynamics Reveals Cell Cycle-Dependent Clustering of Telomerase at Elongating Telomeres. *Molecular Cell*. 2011 Dec;44(5):819–27.
143. Schmidt JC, Zaug AJ, Cech TR. Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell*. 2016 Aug;166(5):1188-1197.e9.
144. Querido E, Chartrand P. Using Fluorescent Proteins to Study mRNA Trafficking in Living Cells. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2020 Oct 30]. p. 273–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X08850121>
145. Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast. *Molecular Cell*. 1998 Oct;2(4):437–45.
146. Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):217–24.
147. Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol*. 2006 May;24(5):577–81.
148. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003 Jan;60(5):523–33.

149. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*. 2005 Jun;23(6):316–20.
150. Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, et al. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem Biol*. 2008 Jun;3(6):373–82.
151. Schmidt JC, Zaug AJ, Kufer R, Cech TR. Dynamics of human telomerase recruitment depend on template-telomere base pairing. *Mol Biol Cell*. 2018 Apr 1;29(7):869–80.
152. Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, et al. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*. 2017 Feb 15;115:80–90.
153. Stauffer W, Sheng H, Lim HN. EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):15764.
154. Kalaidzidis Y. Intracellular objects tracking. *Eur J Cell Biol*. 2007 Sep;86(9):569–78.
155. Sheng H, Stauffer W, Lim HN. Systematic and general method for quantifying localization in microscopy images. *Biology Open*. 2016 Dec 15;5(12):1882–93.
156. Sheng H, Stauffer WT, Hussein R, Lin C, Lim HN. Nucleoid and cytoplasmic localization of small RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 23;gkx023.
157. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006 Dec;224(3):213–32.
158. Pigeon SV, Nicovich PR, Mollazade M, Tabarin T, Gaus K. Clus-DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data. Lidke D, editor. *MBoC*. 2016 Nov 7;27(22):3627–36.
159. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):676–82.
160. Ryder PV, Lerit DA. Quantitative analysis of subcellular distributions with an open-source, object-based tool. *Biol Open*. 2020 Oct 19;9(10):bio055228.
161. Cordelières FP, Bolte S. Experimenters' guide to colocalization studies: finding a way through indicators and quantifiers, in practice. *Methods Cell Biol*. 2014;123:395–408.
162. Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, Dupuis-Sandoval F, Scott MS, Bachand F. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Reports*. 2015 Dec;13(10):2244–57.
163. Zhong F, Savage SA, Shkreli M, Giri N, Jessop L, Myers T, et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev*. 2011 Jan 1;25(1):11–6.

164. Persson F, Barkefors I, Elf J. Single molecule methods with applications in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013 Aug;24(4):737–44.
165. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJS, Holroyd A, Wang Y, et al. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2014 Jan;46(1):56–60.
166. Gu P, Wang Y, Bisht KK, Wu L, Kukova L, Smith EM, et al. Pot1 OB-fold mutations unleash telomere instability to initiate tumorigenesis. *Oncogene*. 2017 Apr 6;36(14):1939–51.
167. Singh U, Maturi V, Westermark B. Evidence for multiple forms and modifications of human POT1. *DNA Repair*. 2013 Nov;12(11):876–7.
168. Miyagawa K, Low RS, Santosa V, Tsuji H, Moser BA, Fujisawa S, et al. SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1^{TPP1} to modulate shelterin–Stn1 interaction in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Apr 22;111(16):5950–5.
169. Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res*. 2012 Feb 1;730(1–2):12–9.