

Université de Montréal

Titre du mémoire ou de la thèse

*Investigation des fonctions de la protéine du pore nucléaire TPR en utilisant la microscopie à
molécule unique*

Par

Bineta Bop

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté(e) en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biochimie, option générale

Août 2022

© Bop, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Ce mémoire est intitulé

Titre du mémoire ou de la thèse

***Investigation des fonctions de la protéine du pore nucléaire TPR en utilisant la microscopie à
molécule unique***

Présenté par

Bineta Bop

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

Pascal Chartrand

Président-rapporteur

Daniel Zenklusen

Directeur de recherche

François Robert

Membre du jury

Résumé

Le complexe de pores nucléaires est le seul point d'entrée et de sortie du transport nucléocytoplasmique. Le panier nucléaire, l'un de ses principaux composants, s'est avéré impliqué dans la régulation des gènes et pourrait jouer un rôle majeur dans le contrôle de la qualité de l'export d'ARNm. Cependant, on sait peu de choses sur le fonctionnement du panier dans l'export nucléaire et la régulation des gènes. La principale composante structurelle du panier, la TPR (*Translocated Promoter Region*), est considérée comme l'acteur principal de la fonction de contrôle de la qualité du panier. Il reste à établir par quel mécanisme cette protéine assure la sélection des mRNP compétentes pour l'exportation. Malgré son implication connue dans le contrôle de la qualité des mRNP, l'exportation et la maturation, des questions demeurent: que fait vraiment le panier, qu'est-ce qui définit le contrôle qualité, comment le panier nucléaire est-il capable d'identifier l'ARN qui n'est pas compétent pour l'exportation et quels sont les rôles de différentes protéines composant le panier nucléaire.

Récemment, il a été montré que la protéine TPR est présente dans deux populations, l'une dans le nucléoplasme et l'autre liée au NPC. Nos études préliminaires utilisant FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) et la microscopie à molécule unique montrent que les molécules nucléoplasmiques de TPR ne sont pas impliquées dans un échange rapide avec les molécules assemblant avec les paniers ancrés au NPC et présentent différentes sous-populations basées sur la diffusion. L'analyse de études protéomiques préliminaires de notre laboratoire a révélé que l'interactome de TPR présente un enrichissement inattendu en protéines impliquées dans la maturation de l'ARNm, notamment l'épissage et les facteurs de traitement de l'extrémité 3'. Ces résultats pourraient suggérer des interactions complexes des nouvelles fractions nucléoplasmiques de TPR avec la machinerie de maturation des ARNms et nous amènent à poser les questions suivantes : Quelle est la fonction de la protéine du panier TPR lorsqu'elle n'est pas associée au NPC, et la TPR nucléoplasmique participe-t-elle au métabolisme de l'ARN nucléaire, reliant potentiellement les processus nucléaires au contrôle de la qualité au NPC?

Mon projet s'est concentré sur l'étude des fonctions et de la dynamique de la protéine du panier nucléaire TPR à l'aide de techniques d'imagerie fluorescente en cellule vivante et de suivi de protéine unique. Nous avons pu identifier la dynamique et la localisation des différentes

populations de TPR à partir des profils de diffusion de leurs trajectoires, qui peuvent être réparties en 5 catégories : *Dirigée*, *Brownienne*, *Restreinte*, *Confinée* et *Butterfly*. Nos données suggèrent que les trajectoires *confinées* pourraient être liées à l'association de TPR à la chromatine tandis que les *browniennes* représenteraient les molécules de TPR diffusant librement dans le noyau. De plus, nous avons constaté que les trajectoires *dirigées* et *restreintes* pourraient être liées à la maturation de l'ARN vu que ces deux sous-populations de TPR sont les plus affectées lorsque la transcription est inhibée. Également, en absence de la transcription par l'ARN polymérase II, TPR forme des granules dans le nucléoplasme, suggérant son implication durant la transcription active. Ainsi, notre étude montre que la fraction nucléoplasmique du TPR est subdivisée en fractions non associées aux pores hétérogènes qui pourraient jouer plusieurs rôles dans le métabolisme de l'ARN et la qualité de l'export.

Mots-clés : Complexe de pore nucléaire, Panier nucléaire, TPR (*Translocated Promoter Region*), Dynamique de TPR, métabolisme des ARN messager, Suivi de molécule unique, Microscopie en cellule vivante.

Abstract

The nuclear pore complex is the only entry and exit point for the nucleocytoplasmic transport. The nuclear basket, one of its main components, was shown to be involved in gene regulation and could play a major role in quality control of mRNA export. However, little is known on how the basket functions in nuclear export and gene regulation. The main structural component of the basket, TPR (*Translocated Promoter Region*), is thought to be the main actor in the quality control function of the basket. It is yet to be established by which mechanism this protein ensures the selection of competent mRNPs for export. With all these involvement of the basket in quality control, export, and maturation, one question remains: What is the basket really doing, what defines quality control, how the nuclear basket can identify RNAs that aren't competent for export, and what are the roles of the different proteins that make up the basket.

Recently it was shown that TPR is present in two populations, one in the nucleoplasm and another bound at the NPC. Our preliminary studies using FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) and single molecule microscopy shows that the nucleoplasmic TPR molecules aren't exchanging with the baskets anchored at the NPC and present different subpopulations based on diffusion. Analysis of preliminary proteomics studies from our laboratory revealed an interactome with an unexpected enrichment of proteins involved in mRNA maturation notably splicing and 3' end processing factors. These results imply complex interactions of the new fractions of TPR and lead us to ask these following questions: What is the function of the basket protein TPR when it is not associated with the NPC, and does nucleoplasmic TPR participate in nuclear RNA metabolism, potentially linking nuclear processes to quality control at the NPC?

My project focused on investigating the functions and dynamics of the nuclear basket protein TPR using fluorescent live-cell and single-protein imaging techniques. We were able to identify the dynamics and localization of the different populations of TPR based on the diffusion profiles of their trajectories, which can be divided in 5 categories: Directed, Brownian, Restricted, Confined and Butterfly. Our data suggest that the confined population might be linked to chromatin association of TPR, whereas the Brownian would represent the free diffusing TPR molecules in the nucleus. We further found that the Directed and Restricted trajectories could be linked to RNA maturation as these two subpopulations of TPR are most affected when transcription is inhibited.

Moreover, in absence of transcription, TPR forms granules in the nucleus, suggesting its implication during active transcription. Altogether, our study shows that the nucleoplasmic fraction of TPR is subdivided in heterogenous diffusive fractions that could play several roles in the metabolism of RNA and quality of export.

Keywords: Nuclear pore complex, Nuclear basket, TPR (*Translocated Promoter Region*), Dynamics of TPR, mRNA metabolism, Single-molecule imaging, live-cell imaging.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements.....	21
1. Introduction générale	23
1.1. Le complexe de pore nucléaire	23
1.1.1. Structure du complexe	24
1.2. Fonctions du pore nucléaire	26
1.2.1. Le panier nucléaire.....	26
1.2.1.1. Structure du panier nucléaire	26
1.2.1.2. Fonction du panier nucléaire dans le noyau.....	27
1.2.1.2.1. Organisation de la chromatine	27
1.2.1.2.2. Régulation de l'expression génique.....	28
1.3. Fonctions nucléoplasmiques des nucléoporines dynamiques.....	29
1.3.1. Les fonctions de NUP96 et NUP98.	30
1.3.2. Les fonctions des NUPs du panier nucléaire	31
1.3.3. Le panier nucléaire et l'export des ARNs	32
1.3.3.1. L'arrimage des mRNPs	32
1.3.3.2. Contrôle qualité des ARNm par le panier nucléaire	34
1.4. Transport des ARNs : de la transcription au panier	36

1.4.1.	Épissage et maturation des ARN	38
1.4.2.	Les Facteurs Nucléaires facilitant l'export sélectif des ARNs	38
1.4.3.	Transport des mRNPs à la périphérie	40
1.4.4.	Le rôle du panier nucléaire et de ses protéines d'interaction dans l'export des ARNm	41
1.4.5.	Sélectivité de l'export des ARNm.....	42
1.5.	Approche de microscopie – Single Molecule Tracking.....	43
1.5.1.	Microscopie à molécule unique sur cellules vivantes.....	43
1.5.2.	Méthode d'analyse - SMT	45
2.	Objectifs et hypothèse.....	49
3.	Matériels et méthodes	52
3.1.	Construction des plasmides.....	52
3.2.	Culture cellulaire et transfection.....	52
3.3.	Immunofluorescence avec HaloTag :	53
3.4.	Microscopie en cellules vivantes	53
3.5.	Microscopie à molécule unique	54
3.6.	Suivi de molécule unique.....	54
3.7.	Analyse des données avec Fiji-TrackMate	55
4.	Résultats.....	57
4.1.	Mise en place d'une approche de microscopie pour étudier les dynamiques de TPR au niveau des molécules uniques en cellule vivante.....	57
4.1.1.	TPR est présente dans le noyau en deux fractions.....	57
4.1.2.	Les sous-populations de TPR dans le nucléoplasme	60
4.2.	La distribution de TPR dans le noyau.....	63
4.2.1.	Méthode d'analyse des trajectoires.....	63
4.2.2.	Paramètre de diffusion de TPR.....	64

4.2.3.	Différents modes de diffusion de TPR de la périphérie au nucléoplasme	79
4.3.	L'inhibition de la transcription affecte la distribution de TPR dans le noyau	82
4.3.1.	TPR forme des granules nucléaires après traitement avec DRB	82
4.3.2.	Dynamique de la formation des agrégats contenant TPR dans le noyau	87
4.4.	L'inhibition de la Pol-II affecte les populations de la fraction nucléoplasmique de TPR	91
4.4.1.	L'inhibition de la Pol-II cause une baisse de la diffusion des molécules de TPR nucléoplasmique	91
	Comparaison de la distribution des coefficients de diffusion en présence et en absence de DRB	91
	Comparaison de la distribution de chaque type de trajectoires avec ou sans DRB	95
4.4.2.	L'inhibition de la transcription affecte le pourcentage des sous-populations de TPR nucléoplasmique	101
4.4.3.	Le traitement avec DBR cause un enrichissement des populations de TPR dans une zone restreinte	103
5.	Discussion	109
5.1.	Mise en place de la méthode de microscopie à molécule unique : atteindre le meilleur ratio S/BF	109
5.1.1.	Spinning Disk vs HILO illumination	109
5.1.2.	Choix du marquage pour le suivi des molécules uniques : GFP vs Halo	111
5.1.3.	Marquage sous-stœchiométrique vs photo-activable de TPR	112
5.1.4.	Détection de différentes populations selon leur mode de diffusion	115
5.2.	Approche méthodologique pour générer les données de SMT de TPR-Halo	117
5.2.1.	Traitement des images obtenues en microscopie en cellule vivante	117
5.2.2.	Analyse des sous-populations de TPR selon une méthode de suivi de molécule unique	118
5.2.2.1.	Méthode d'analyse et caractéristiques des trajectoires	118

5.2.2.2.	Classification des trajectoires selon leur mouvement.....	119
5.3.	Les fonctions de la fraction nucléoplasmique de TPR.....	124
5.3.1.	La distribution de TPR dans le nucléoplasme suggère une fonction distincte de celle des molécules de TPR associées au NPC.....	124
5.3.2.	L'inhibition de la transcription via Pol-II induit la formation de granules de TPR	125
5.4.	Caractérisations des types de trajectoires de la population nucléoplasmique de TPR	128
5.4.1.	La fraction de TPR nucléoplasmique en diffusion libre n'est pas affectée par l'absence de la transcription via Pol-II	128
5.4.2.	La sous-population nucléoplasmique de TPR interagit avec la chromatine	129
5.4.3.	La sous-population nucléoplasmique de TPR pourrait être impliquée dans le processus de maturation des ARN	130
5.4.3.1.	La diffusion de TPR suggère une localisation dans les NS	130
5.4.3.2.	La distribution de TPR suggère un rôle dans le processus d'export des ARN	131
6.	Conclusion et perspectives.....	134
	BIBLIOGRAPHIE.....	136

Liste des tableaux

Tableau 1. – Paramètres des différents types de trajectoires de TPR nucléoplasmique.....	65
Tableau 2. – Comparaison du nombre de granules entre DRB et CTRL.	86
Tableau 3. – Comparaison de la diffusion entre les conditions DRB et CTRL.....	95

Liste des figures

Figure 1. –	Architecture moléculaire, de la composition et des fonctions du complexe de pore nucléaire. ¹	26
Figure 2. –	Processus d'export de l'anneau de Balbiani à travers le complexe de pore nucléaire.	33
Figure 3. –	Étapes de l'export des ARNm de la transcription nucléaire à l'export dans le cytoplasme.	37
Figure 4. –	Différents coefficients de diffusion reportés dans des cellules humaines. ⁷⁸	46
Figure 5. –	Modélisation des types de trajectoires selon le coefficient de diffusion et le niveau de confinement.	48
Figure 6. –	(A) Coupe confocal de cellules HEK TPR-GFP acquise par microscopie à disque rotatif.	50
Figure 7. –	Schéma de la construction de la lignée cellulaire HEK293FT - TPR-Halo.	59
Figure 8. –	Marquage de la lignée cellulaire HEK293F TPR-Halo avec deux méthodes.	61
Figure 9. –	Trajectoires <i>Dirigées</i> .	67
Figure 10. –	Trajectoires <i>Browniennes</i> .	69
Figure 11. –	Trajectoires <i>Restreintes</i> .	71
Figure 12. –	Trajectoires <i>Confinées</i> .	73
Figure 13. –	Trajectoires <i>Butterfly</i> .	75
Figure 14. –	Distribution des sous-populations de TPR.	77
Figure 15. –	Comparaison des types de trajectoires incluant la périphérie nucléaire.	81
Figure 16. –	Représentation schématique de la prise d'images sur l'axe Z.	83
Figure 17. –	L'inhibition de la transcription Pol-II affecte la distribution de TPR dans le noyau.	85
Figure 18. –	TPR est présente dans le noyau sous forme de granules.	88
Figure 19. –	L'inhibition de la transcription Pol-II affecte la distribution des granules de TPR.	90
Figure 20. –	Comparaison des coefficients de diffusion de la population nucléoplasmique de TPR en présence de DRB.	94

Figure 21. – Comparaison des coefficients de diffusion des trajectoires <i>confinées</i> et <i>browniennes</i> de TPR nucléoplasmique.	97
Figure 22. – Comparaison des coefficients de diffusion des trajectoires <i>dirigées</i> et <i>restreintes</i> de TPR nucléoplasmique.	100
Figure 23. – Distribution des sous populations de TPR en présence de DRB.	102
Figure 24. – Deux paramètres de mobilité sont évalués pour des trajectoires confinées. (A) Le rayon de confinement est mesuré en ajustant des courbes T-MSD individuelles avec un modèle de diffusion confiné en cercle et estime le cercle englobant la zone de mouvement. (B) Le déplacement moyen correspond à la distance euclidienne moyenne entre deux positions consécutives de la molécule dans la zone de mouvement ⁷⁵	104
Figure 25. – L'inhibition de la transcription favorise le confinement des sous-populations de TPR.	106
Figure 26. – Classification des trajectoires selon la valeur alpha. La courbe α T-MSD de la composante d'échelle est utilisée pour conserver des trajectoires confinées, correspondant aux molécules associées à la chromatine ; et rejeter les trajectoires de diffusion facilitées et pures, correspondant aux molécules non associées à la chromatine ⁷⁵	119
Figure 27. – Modèle de la dynamique de TPR dans le noyau. Les différents types de mouvements identifiés dans ce mémoire sont indiqués dans la légende en haut à droite.	124
Figure 28. – Modèle d'interaction de TPR nucléoplasmique à différentes étapes du métabolisme des ARNm.	133

Liste des sigles et abréviations

NPC : Nuclear Pore Complex

TPR: Translocated Promoter Region

mRNP: messenger ribonucleoprotein

Pol-II: Polymerase II

RBP: RNA binding protein

DRB: 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside

SIM: structured illumination microscopy

TREX: Transcription and Export

AP: Affinity purification

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

ET: Exposure time

Df: Diffusion Coefficient

FG: Phenylalanine-Glycine

NUP: Nucleoporin

NXF1: Nuclear Export Factor 1

hnRNP: heterogenous nuclear RNP

snRNA: small nuclear ARN

CRM1: chromosome region maintenance protein 1

GANP: Germinal-centre Associated Nuclear Protein

lncARN: long non-coding RNA

SMT: Single Molecule Tracking

TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence

HILO: Highly Inclined and Laminated Optical sheet (HILO).

MSD: Mean Square Displacement

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleachi

Remerciements

Je souhaiterai tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Daniel Zenklusen pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour sa forte contribution dans mon apprentissage en recherche, mais également pour son aide et ses conseils durant ma maîtrise et durant l'écriture de ce mémoire.

Je voudrai également remercier tous les membres du laboratoire, notamment Pascal, le rock du laboratoire. Ces conseils m'ont permis d'avancée dans ma recherche et son expertise fût indispensable pour le bon déroulement des expériences. Sa présence dans le laboratoire est l'une des principales raisons pour lesquels l'atmosphère du laboratoire est détendue.

Je remercie spécialement Pierre pour m'avoir d'abord introduit à ce laboratoire lors que mon stage en biochimie, pour avoir été un mentor durant ma maîtrise. Je suis fortement reconnaissante pour le temps et l'effort qu'il a bien voulu me consacrer afin de m'aider durant l'écriture et la correction de ce mémoire.

Je réserve des remerciements particuliers à ma famille pour m'avoir supporté durant tout mon parcours académique. Merci à mes parents pour leur appui et leur encouragement et pour m'avoir donné la force de surmonter tous les obstacles.

Finalement, je remercie tous les professeurs qui ont contribué à ma formation en biochimie et mon permis de poursuivre mes études en recherche.

1. Introduction générale

L'expression génique est un processus cellulaire fondamental nécessitant l'interaction de complexes via des échanges nucléocytoplasmiques. La régulation de ces derniers est médiée par un seul point d'entrée et de sortie : le complexe de pore nucléaire (NPC). Cet assemblage de macromolécules est ancré dans l'enveloppe nucléaire et est composé de 3 domaines principaux, dont une structure filamenteuse dans la face nucléoplasmique nommée panier nucléaire ^{1, 2}. Cette composante du NPC, dont la principale protéine structurale est TPR (Translocated Promoter Region) possède plusieurs fonctions. En effet, TPR est notamment impliquée dans le contrôle de qualité de l'export des ARNm, dans la formation de zones sans hétérochromatine autour du NPC et dans la rétention nucléaire d'ARNm non épissés ou non matures. Au cours de la maturation des ARNs, les mRNPs (particules ribo-nucléoprotéiques) composées de protéines liées aux ARNm, une fois au niveau de la périphérie, rencontrent le panier en premier avant d'être acheminées dans le canal de transport du pore nucléaire ¹. Cependant, malgré son rôle central dans divers processus d'échanges nucléocytoplasmique, son mécanisme de fonction, c'est-à-dire son mode de régulation de l'accès au cytoplasme, est encore mal caractérisé. Étant donné ce manque de compréhension du panier nucléaire, nous chercherons à étudier les fonctions de la protéine TPR liées à l'ARNm et l'expression des gènes en disséquant le rôle du panier dans la régulation de l'accès des mRNPs au NPC.

1.1. Le complexe de pore nucléaire

Dans les cellules eucaryotes, la ségrégation des événements de transcription et de traduction de l'ARNm permet d'assurer leur régulation et maintenir l'expression génique. Cette spécialisation des processus biologiques s'accompagne d'une grande complexité, notamment dans la régulation du trafic nucléocytoplasmique ^{1, 2}. Ces échanges sont critiques non seulement lors de l'import de protéines jouant un rôle nucléaire, comme les histones, mais également lors de l'export régulée de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme où ils seront par la suite traduits en protéines. Ce cycle de communication est assuré au niveau du noyau par un complexe macromoléculaire étant le seul

chemin pouvant être emprunté par les macromolécules cellulaires; le Complexe de Pore Nucléaire. ³

1.1.1. Structure du complexe

Le NPC est un large assemblage de protéines insérées dans l'enveloppe nucléaire formant un canal aqueux spécialisé sur son versant cytoplasmique et un nucléaire (voir plus bas). Par leurs larges poids moléculaires, soit environ 60MDa chez la levure et 120MDa chez l'humain, les NPCs se classent parmi les plus grands complexes macromoléculaires de la cellule ¹⁻⁵. Approximativement 30 différentes protéines, présentes en plusieurs copies, appelées nucléoporines (NUPs) permettent son assemblage. Il a été montré qu'il existe une grande conservation évolutive entre ces NUPs chez les eucaryotes, allant de la levure à l'humain ^{1, 2}. Ce complexe est une structure symétrique répartie en 3 domaines principaux (fig.1a). En premier, nous avons l'anneau interne qui se retrouve fusionné à l'enveloppe nucléaire. Il forme de canal central de passage et est associé à deux autres anneaux de part et d'autre de la membrane nucléaire. Les NUPs composant cette association d'anneaux sont dites comme étant les NUPs d'échafaudage, car elles servent principalement à l'architecture du pore. Une autre classe de NUPs cela dit, réside principalement dans le canal et forme l'intérieur du canal de passage. Ces dernières se distinguent des NUPs d'échafaudages par la présence de répétitions de séquences d'acides aminés enrichies en résidus phénylalanine et glycine (F-G), d'où le nom de F-G NUPs (fig.1a). Ces filaments forment une maille désordonnée possédant des propriétés spécifiques permettant la sélection de molécules candidates au transport à travers le pore ¹⁻⁵.

Au niveau des anneaux externes du NPC, se trouvent des protéines périphériques distribuées asymétriquement conférant le sens de diffusion aux molécules devant traverser le canal. Sur la face cytoplasmique, il est montré qu'il existe les filaments qui s'étendent dans le cytoplasme et qui sembleraient aider dans l'arrimage de complexes au niveau du NPC et faciliter leur import. De plus, les protéines des filaments cytoplasmiques facilitent le transfert de différents complexes au cours de l'étape finale de l'export afin qu'ils se rendent au cytoplasme ^{1, 2, 6}.

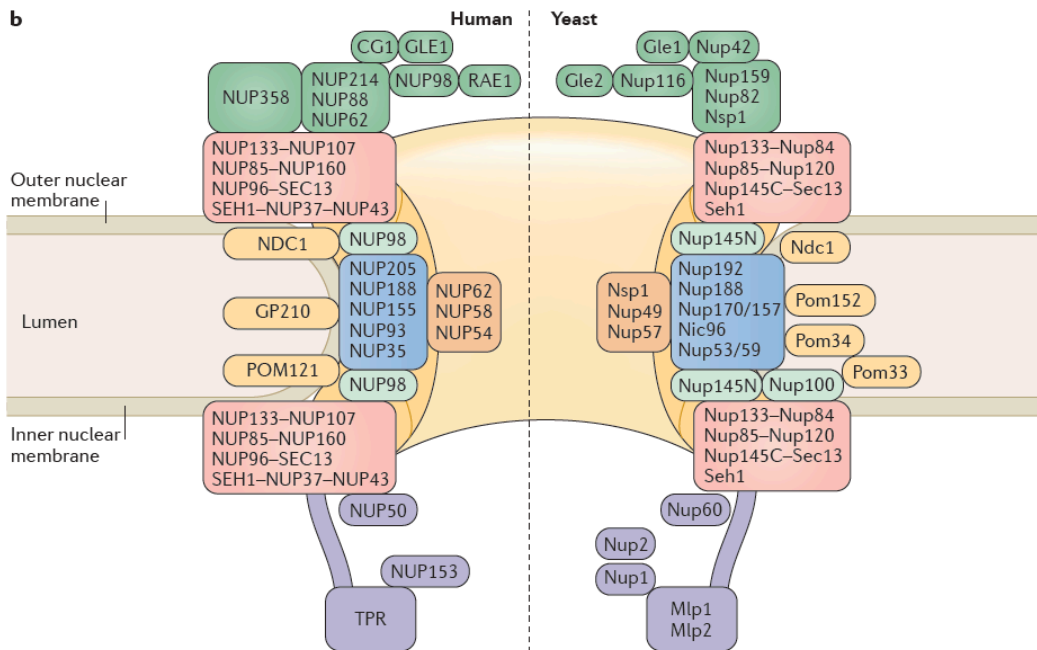
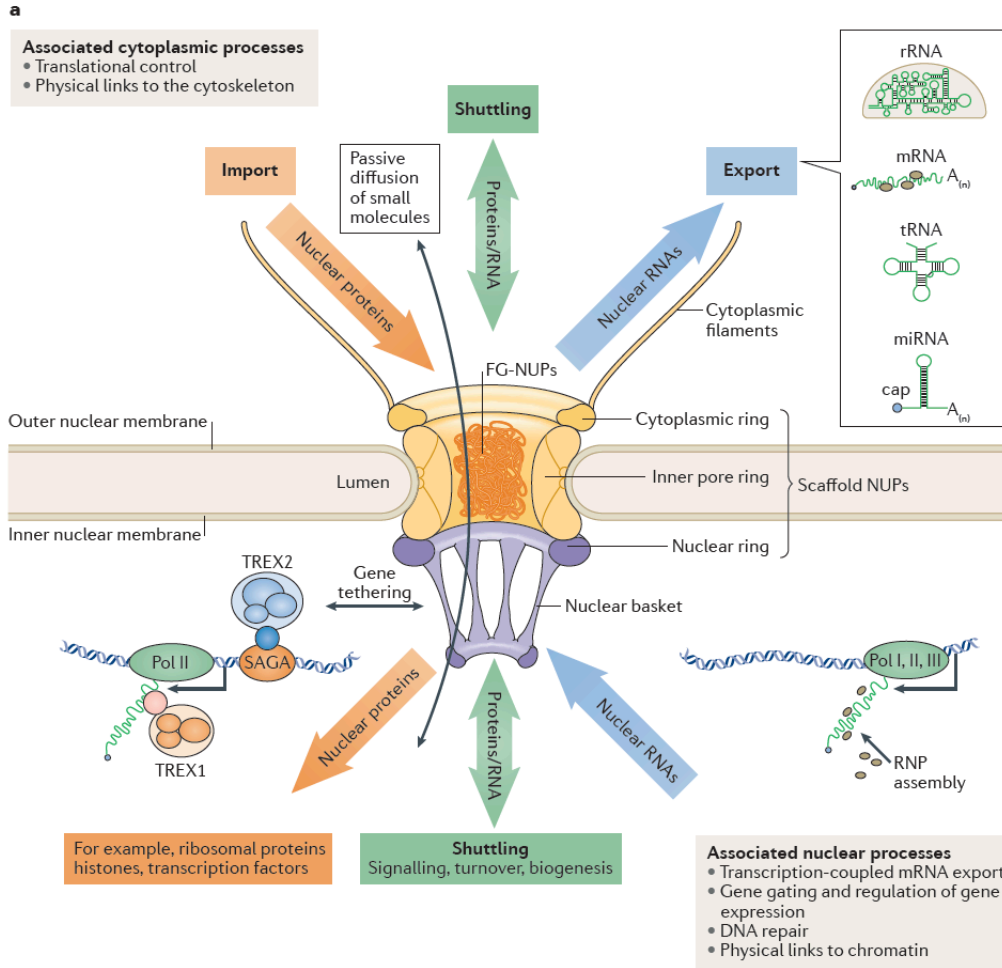


Figure 1. – Architecture moléculaire, de la composition et des fonctions du complexe de pore nucléaire.¹

(a) Illustration des éléments structuraux clés du NPC et des différentes fonctions principales et non-canoniques associées au complexe. (b) Localisation et organisation structurale des NUPs conservés chez la levure et chez l'humain.

1.2. Fonctions du pore nucléaire

Le rôle principal du NPC est d'assurer le transport nucléocytoplasmique des macromolécules cellulaires. En effet, seules les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 30kDa sont capables de diffuser dans le pore et de traverser le réseau formé par les filaments des F-G NUPs^{1-3,5}. Au-delà de ce seuil, des protéines spécifiques dédiées à la médiation du transport dans le pore (comme les Nuclear Transport Receptors récepteurs de transport nucléaire) sont nécessaires pour la translocation via une interaction de faible affinité avec les domaines F-G dans le canal du pore (fig.1a). Cependant, le NPC est aussi impliqué dans plusieurs processus nucléaires importants pour l'expression des gènes^{1,2}. Ces fonctions nucléaires du pore sont principalement assurées par une structure nucléaire du complexe, le panier.

1.2.1. Le panier nucléaire

1.2.1.1. Structure du panier nucléaire

Le panier nucléaire est un sous complexe du NPC situé dans la face nucléoplasmique du noyau. Il est composé de 8 filaments associés à l'anneau interne du pore dont l'organisation s'apparente à un panier^{7,8}. Cette structure est conservée chez les eucaryotes et est composée de 3 principales nucléoprotéines, soit NUP50, NUP153 et TPR (fig.1b). Cette dernière, ayant pour paralogue Mlp1/Mlp2 chez la levure représente le composant principal du panier (fig.1b). En effet, cette large protéine filamenteuse (270 KDa) comprend sur les 2/3 de sa longueur des régions en hélice ainsi qu'un domaine dit intrinsèquement désordonné dans son dernier tiers situé à la queue C-terminal⁸. Il a été suggéré que les régions en super hélice sont responsables de la formation des branches du panier tandis que la partie C-terminal de la protéine prend la forme d'un anneau distal.

Ceci a été observé dans les oocytes de *Xenopus* à l'aide de microscopie électronique. Aussi bien chez la levure que chez l'humain, l'absence du TPR (Mlp1/2) mène à la formation de pore sans panier ce qui appuie son rôle structural dans la formation du panier ^{9, 10}.

1.2.1.2. Fonction du panier nucléaire dans le noyau

Le panier nucléaire joue un rôle clé dans le transport nucléocytoplasmique mais est aussi impliqués dans l'organisation du noyau, notamment de la chromatine et des lamines, dans des mécanismes de réparation de l'ADN et de la régulation de l'expression génique (fig.1a) ¹.

1.2.1.2.1. Organisation de la chromatine

Les études des NPCs en microscopie électronique, montrent que ces derniers se retrouvent dans des zones sans hétérochromatine. Ces régions appelées zones d'exclusion de chromatine sont dépendantes de la protéine structurale du panier nucléaire, soit TPR. Ainsi, il est suggéré que les NPCs maintiennent l'euchromatine à la périphérie nucléaire ¹¹⁻¹³. Le panier nucléaire donc permet la formation de zones accessibles autour du NPC, sachant que la périphérie est généralement tapissée de cette chromatine fortement compactée. En effet, à la suite d'une délétion de TPR, il a été observé qu'un recouvrement des NPCs par l'hétérochromatine se produisait, rendant possiblement limitant l'accès au pore ¹³. Ainsi, le panier nucléaire jouerait un rôle en limitant l'encombrement généré par la chromatine, facilitant les mouvements de diffusion des éléments candidats à l'export.

Également, plusieurs études ont montré l'existence de rôles fonctionnels des NUPs du NPC par l'intermédiaire de leur liaison avec la chromatine. En effet, les certains « super-enhancers » (SE), qui sont des structures de régulation de l'expression génique de gènes clés déterminant pour l'identité cellulaire, sont ciblés par le NPC ¹¹⁻¹⁴. L'association de ces SE avec les NUPs les localisent à la périphérie nucléaire et leur régulation par le NPC varient selon le type cellulaire. Lorsque l'attachement du NPC est inhibé, des changements importants dans l'expression génique ainsi qu'une perturbation de ces SE est observée. Ainsi, en raison de leur rôle régulateur de gènes

définissant l'identité cellulaire, le NPC jouerait donc un rôle dans le maintien du destin cellulaire par son association avec ces SE ¹¹⁻¹⁴.

1.2.1.2.2. Régulation de l'expression génique

Le NPC est composé de différents types de NUPs dont certaines peuvent avoir différentes fonctions dans le noyau. En effet, certaines NUPS sont en association dynamique avec le NPC, donc capable d'être liées et se détacher du complexe NPC périodiquement. Ce type d'association suggère que cette proportion des NUPs dynamique aurait différentes fonctions dans le nucléoplasme. Un des exemples les plus marquants est NUP98, se situant entre le panier nucléaire et l'anneau nucléoplasmique. En effet, cette NUP est capable de lier des gènes au niveau du NPC mais aussi dans le nucléoplasme, menant à des niveaux d'activation élevés de ces gènes cibles ¹⁴. ¹⁵. Une composante du panier nucléaire, NUP153, joue un rôle similaire de liaison de gènes, bien que son effet dans leur activation ne soit pas clair pour le moment.

De plus, des études d'immunoprécipitation de la chromatine dans différents organismes ont montré que les composants du NPC interagissent avec la chromatine ¹⁶. En effet, parmi les fonctions suggérées des interactions entre le NPC, incluant les protéines du panier et les gènes, une des idées initiales proposées fut appelée le « *gene gating* » ¹⁷. Cette hypothèse postule que les gènes seraient ciblés à proximité du NPC où les ARNm naissants pourraient être maturés et entrer en association avec les facteurs d'export plus rapidement. Ceci implique une forte expression des gènes à la périphérie nucléaire ¹⁴. Ensemble, ces observations suggèrent que les interactions des composants du NPC avec la chromatine active sont impliquées dans la régulation de l'expression génique. Cependant, les mécanismes d'action expliquant comment ce processus est achevé sont encore peu compris.

De plus, il est intéressant de noter qu'il a récemment été montré qu'il existerait une fraction de TPR dans le nucléoplasme (fig.6a)¹⁸. Contrairement à NUP153 et NUP50, les études préliminaires de notre laboratoire suggèrent que l'association de TPR avec le pore nucléaire n'est pas dynamique, comme en témoigne une récupération lente et incomplète du signal à la membrane du noyau observée lors d'expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (fig.6b). Ceci suggère que le TPR, une fois attaché au NPC, reste stablement ancré. Le rôle de la

fraction nucléoplasmique de la protéine TPR ne semble donc pas être de constituer un groupe de remplacement des TPRs formant les paniers et mène à une interrogation sur les possibles rôles de cette fraction nucléoplasmique de TPR, ce qui est le point principal de mon projet de maîtrise ¹⁸.

1.3. Fonctions nucléoplasmiques des nucléoporines dynamiques

Le NPC représente un composant essentiel du noyau de la cellule eucaryote à travers ces différentes fonctions et son haut niveau de conservation aussi bien dans la levure que dans les cellules de mammifères. Comme mentionnée plus haut, ce complexe macromoléculaire est impliqué dans plusieurs processus cellulaires en plus de son rôle de transporteur nucléaire, notamment l'activation de la transcription, de l'élongation, la maturation et la stabilisation des ARNs mais également le « *gene silencing* » ^{19, 20}. Au cours de ces dernières années, plusieurs études sur son implication dans la régulation des gènes ont identifié plusieurs nucléoporines responsables de ces fonctions en plus de leur action principale dans le transport nucléocytoplasmique. En effet, le NPC est une structure extrêmement stable une fois assemblée. Cependant, les études menées sur la fonction du NPC lié à la chromatine suggèrent qu'il existe des nucléoporines individuelles et dynamiques qui s'étendent au-delà du NPC et de la périphérie nucléaire ^{21, 22}.

Le temps de résidence au NPC serait un moyen d'expliquer cette différence de dynamique. Par exemple, dans le canal central, les nucléoporines forment un échafaudage extrêmement stable dont la dissociation arrive uniquement à la mitose. En contraste, dans les eucaryotes supérieurs, plusieurs nucléoporines sont dynamiques et se localisent dans le nucléoplasme. Ces dernières assurent plusieurs fonctions dans les cellules aussi bien dans les interactions avec la chromatine que dans la différenciation cellulaire ^{20, 23}. Parmi les nucléoporines ayant des fonctions dans le noyau, nous avons d'abord deux composants du pore nucléaire, NUP153 et NUP50 ainsi que NUP98, un composant du complexe Y du NPC, qui sembleraient agir sur la transcription des gènes. Ainsi, la description des rôles de chacune des nucléoporines précédemment citées met en évidence la versatilité de ces protéines dans la cellule ¹.

1.3.1. Les fonctions de NUP96 et NUP98.

Le NPC forme une structure stable à la suite de son assemblage à la fin de la mitose ²⁴. L'échafaudage principale du complexe est le canal principal composé d'une variété de nucléoporines, dont l'interaction est stable. Cependant, un gène précurseur de deux NUPs, soient NUP98 et NUP96, montre que ces dernières ont une action aussi bien au niveau du NPC que dans le nucléoplasme ²⁴.

En effet, NUP96 est un composant du complexe Y qui est essentiel pour l'assemblage du NPC et son ancrage au niveau de l'enveloppe nucléaire mais également dans l'export des ARNs. Une étude dans la levure sur l'homologue de NUP96, suggère que cette nucléoporine pourrait possiblement jouer un rôle dans l'export des ARNs et être impliquée dans la formation de vésicule endoplasmique. Néanmoins, les possibles fonctions de NUP96 dans le nucléoplasme restent encore à déterminer ²⁵.

Dans le cas de NUP98, cette protéine est dynamique et se retrouve simultanément dans le nucléoplasme et au niveau du NPC. Une étude a montré que la mobilité de cette nucléoprotéine est liée à une transcription en cours ¹⁹. En raison de sa localisation dans le noyau et au niveau de la périphérie nucléaire, plusieurs études ont été menées pour déterminer ses fonctions en dehors de l'export des ARNs ¹⁹.

NUP98 joue ainsi un rôle important dans l'expression de gène dans le nucléoplasme. Il est intéressant de noter que les fonctions de ces protéines restent très vastes dans le nucléoplasme. Une étude récente sur NUP98 et ses sites de liaisons dans le génome humain montrent que cette nucléoporine est fortement impliquée dans la différenciation cellulaire et l'expression des gènes développementaux ²². Effectivement, l'expérience réalisée pour identifier les sites de liaisons de NUP98 dans différents types cellulaires, notamment ESCs, NeuPCs et des neurones, montrent que chacune des régions est distincte selon les types cellulaires, qui présentent des motifs d'ADN conservés. De plus, dans les cellules neurales progénitrices, NUP98 interagit spécifiquement avec les gènes du développement neural et cette interaction est responsable de leur expression. Ainsi, ces observations suggèrent que NUP98 fait partie de l'une des NUPs individuelles dynamiques étant essentielles dans le rôle du NPC comme un échafaudage pour l'activation transcriptionnelle ²².

1.3.2. Les fonctions des NUPs du panier nucléaire

Le panier nucléaire est un élément essentiel dans le noyau en raison de sa position dans le NPC et de son implication dans le contrôle qualité et l'export des ARNs. Les NUPs responsables de cette structure sont NUP153, NUP50 et TPR, est chacune sont des FG-NUPs. Cependant, bien que le panier soit une structure relativement stable une fois assemblée, il a été montré que chacune de ses composantes est présente en deux fractions, une liée au NPC et une dans le nucléoplasme. La fraction nucléoplasmique de chacune d'entre elle semblerait avoir des fonctions spécifiques qui peuvent être liées ou propres à chaque NUP. Notamment, la présence de NUP50 au niveau du NPC est médiée par une association avec NUP153 au niveau du domaine N-terminale de cette protéine.

19 26

Localisé à la base du panier nucléaire, NUP153 joue un rôle essentiel pour l'ancrage de cette structure au niveau du NPC. Cependant, elle est également l'une des nucléoporines dynamiques identifiées dans le nucléoplasme ²⁷. Comme NUP50, NUP153 est impliquée dans la facilitation du transport nucléocytoplasmique ²⁷. Sa présence au niveau du panier nucléaire est également nécessaire pour NUP50 ainsi que TPR ²⁸. En effet, la déplétion de cette protéine mène à une accumulation de TPR dans le nucléoplasme, cependant, l'effet contraire n'est pas observé lorsque TPR est déplétée ²⁸.

Parmi les nucléoporines dynamiques retrouvées dans le nucléoplasme, NUP50 fait partie de celles qui sont les plus mobiles ²⁹. Son interaction avec le NPC est de quelques secondes, faisant d'elle la nucléoporine dynamique ayant le temps de résidence le plus court au NPC ²⁷. Parmi les protéines interagissant avec le complexe, seuls les récepteurs de transport nucléaires sont plus dynamiques que NUP50 ²⁹. Ceci suggère donc que cette protéine diffuse dans le nucléoplasme pour une majorité du temps lorsqu'elle n'est pas associée au NPC. En raison de sa position au niveau du panier nucléaire et de sa fraction dynamique dans le noyau, plusieurs études ont été menées pour déterminer ses fonctions au-delà du NPC. La distribution de NUP50 dans le noyau est principalement au niveau de la périphérie liée au NPC et également dans le nucléoplasme ^{27, 29}. Afin d'obtenir une meilleure résolution dans le noyau, ces chercheurs ont marqué la chromatine ainsi que l'ADN pour identifier les possibles associations de NUP50. Ces derniers ont observé que

la distribution de NUP50 est relativement uniforme, en revanche, la protéine est exclue des zones d'hétérochromatine, soit le nucléole ^{27, 29}.

NUP50, lorsque soumis à différents inhibiteurs de la transcription, ne réagit pas de façon semblable aux autres nucléoporines étudiées, selon le type d'inhibiteur de la transcription utilisé. Seuls les inhibiteurs intercalant l'ADN affectent la diffusion de NUP50 dans le noyau, tel que l'actinomycine D entre autres. Le traitement avec DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside) n'affecte pas la dynamique de NUP50 mais agit sur NUP153 et NUP98 en les immobilisant ²⁰. En plus de ces observations, il est intéressant de noter que la diffusion dynamique de NUP50 est dépendante de la liaison de l'ARN Pol-II avec la chromatine mais également aux niveaux d'activité transcriptionnelle dans la cellule ²⁰. Ainsi, ces observations sur NUP50 suggèrent que cette nucléoporine dynamique serait potentiellement liée au métabolisme transcriptionnel des cellules à travers sa fraction nucléoplasmique et pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire ²⁰. Ces fonctions nous poussent à nous poser la question : est-ce que les nucléoporines ayant une fraction dans le nucléoplasme sont impliquées dans des fonctions indépendantes de celles du NPC ²⁰?

1.3.3. Le panier nucléaire et l'export des ARNs

1.3.3.1. L'arrimage des mRNPs

Les molécules d'ARNm devant être exportées ne sont jamais seules. Elles sont en association avec des protéines liant les ARNm pour former une large particule de ribonucléoprotéines compétente à l'export (mRNP). Ce complexe se forme à l'aide des protéines de liaison à l'ARNm 'RNA Binding Proteins' (RBP) qui recouvrent les molécules d'ARN et organisent sa structure en trois dimensions ³⁰. Cet « emballage » joue un rôle important dans le niveau d'expression des gènes, notamment pour la formation des mRNPs compétentes à l'export ^{10, 31}. Lorsque ces particules atteignent la proximité de la membrane du noyau, le panier nucléaire est la première structure qu'elles rencontrent. Il est supposé que le mécanisme de transport des mRNPs se fait en trois étapes, une liaison avec le panier nucléaire, une progression dans le panier où ces particules changeraient de conformation par une décompaction avant de passer par le canal central ³¹. Un exemple appuyant ce possible mécanisme est l'anneau de Balbiani. Il s'agit de grands

complexes de mRNPs fortement compactés qui se distinguent par leur taille. La microscopie électronique a permis de montrer son mode d'entrée dans le NPC via le panier nucléaire. En effet, suite à l'arrivée de la particule au panier nucléaire, un changement de conformation survient au niveau de l'anneau distal du panier menant à son entrée dans le pore à travers l'anneau et à son export ³². En raison de l'interaction des mRNPs avec le panier nucléaire, il est possible de suggérer qu'un niveau de compaction plus élevé pour les ARNm serait un mécanisme de sélection illustrant le possible rôle de contrôle qualité que le panier jouerait (Fig. 3). En effet, si les RNPs doivent impérativement passer par le panier, leur compétence à l'export pourrait être évaluée au niveau du panier avant de pouvoir entrer dans le pore ^{10, 31}.

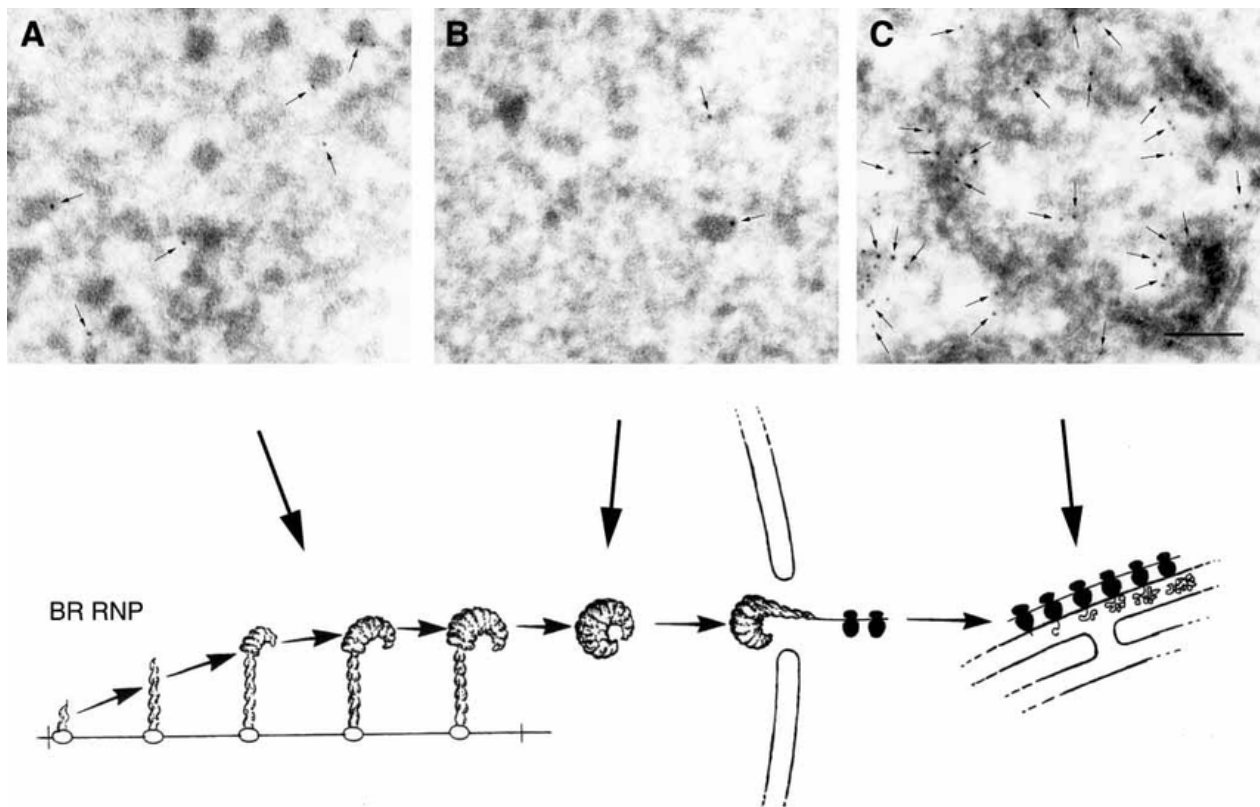


Figure 2. – Processus d'export de l'anneau de Balbiani à travers le complexe de pore nucléaire. Localisation microscopique immuno-électronique de p40/50 dans les anneaux de Balbiani (A), le nucléoplasme (B) et le cytoplasme (C) dans les cellules des glandes salivaires. Le diagramme illustre la décompaction du mRNP de l'anneau de Balbiani vers une forme longue pour son export dans le cytoplasme.

Les grandes flèches relient les micrographies électroniques à l'étape correspondante au cours de la biogenèse de l'ARNm. ³³

1.3.3.2. Contrôle qualité des ARNm par le panier nucléaire

Le contrôle qualité des ARNm représente un processus important pour le maintien de l'intégrité du génome. Cette régulation se produit à plusieurs étapes de la maturation des pré-ARNm ³⁴. Deux types de protéines peuvent être identifiées comme étant des acteurs majeurs dans ce processus. En premier, nous avons les RBPs liant les pré-ARNm dès leur formation, assurant le bon repliement des transcrits ainsi que la compaction des particules. Ceux-ci sont impliqués dans le recrutement du récepteur hétérométrique d'export Nuclear Export Factor 1 (NFX1/NXT1) ³⁵⁻³⁷. Ce récepteur hétérométrique d'export est crucial pour l'export puisqu'il permet d'accéder à l'intérieur du pore nucléaire en interagissant avec les NUPs F-G ³⁴. Ensuite, ces mRNPs interagissent également avec le panier nucléaire, notamment TPR ³⁸. Une accumulation des ARNm dans le noyau peut être observée lorsque TPR est surexprimé. De plus, une délétion de TPR mène à une fuite de pré-ARNm n'ayant pas été maturés correctement, et présentant des défauts d'épissage et de maturation de la région 3' UTR (région non traduite) ^{39, 40}. En raison de ces observations et de son interaction avec différents RBPs, le panier est considéré comme un point de contrôle des mRNPs s'assurant de leur maturité avant leur export ³⁹⁻⁴³.

Une étude sur le contrôle de qualité de l'export des ARNm a tenté de caractériser le possible mode de fonctionnement de ce mécanisme en utilisant une approche expérimentale et computationnelle. En effet, le groupe de Mofrad a utilisé « *Agent-Based Modelling* » afin d'identifier les facteurs nécessaires impliqués dans la rétention des transcrits aberrants en les différenciant de ceux favorisant l'export ⁴⁴. En prenant en compte l'implication du panier nucléaire dans l'export des ARNm et son possible rôle dans la rétention des transcrits aberrants, cette étude se concentre sur les principales protéines impliquées dans l'export nucléaire, soient les RBPs, les facteurs d'export ainsi que TPR ^{34, 42}.

Dans ces simulations, dans un premier temps, l'interaction entre les mRNPs et le récepteur d'export a d'abord été étudiée, sans prendre en compte les interactions avec TPR. Les événements d'épissage permettent de recruter des RBPs favorisant l'export via le recrutement des récepteurs

d'export (ER) ⁴⁵. Si un ARN est non épissé, ce dernier pourrait ne pas avoir la composition optimale en RBP permettant de recruter des ER, parce qu'il n'en recrute pas assez ou bien parce qu'il recrute des RBPs avec une faible affinité pour les ER ^{45, 46}. En considérant les RBPs comme médiateurs de la liaison avec les ER, leur modèle consiste d'abord à tester la probabilité d'export pour des affinités décroissantes de l'interaction RBP-ER. Ils observent que les ARNs liant à faible affinité sont représentés comme étant non épissés. Basés sur des observations expérimentales, ils postulent qu'un mRNP aberrant correspond à un ARN ayant des RBPs avec faible affinité pour le ER ^{46, 47}.

Sur la base de leur modèle d'ARN aberrant, la probabilité d'export selon l'affinité pour les ER a été ainsi étudiée. Leurs résultats montrent qu'une baisse importante de l'affinité réduit le taux d'export des ARNs aberrants. Ainsi, en prenant en compte leurs résultats, ils concluent que la régulation l'affinité entre les RBPs et les récepteurs d'export pourrait jouer un rôle dans la rétention des ARNm aberrants. Cela dit, ce processus n'est pas suffisant pour toutes les configurations des ARNs aberrants ⁴⁴.

Par la suite, l'interaction entre TPR et les RBPs, précédemment non considérée, est réimplantée dans leur modèle de contrôle qualité des ARNm. À partir de leur simulation d'un ARNm lié à 12 RBPs, ce modèle a montré que l'interaction entre TPR et les RBPs, bien que faible, distingue efficacement les ARNm aberrants en les retenant tout en permettant l'export des transcrits normaux. Ainsi, ceci met en évidence l'importance de l'interaction de TPR avec les RBPs dans l'inhibition de l'export des ARN aberrants ⁴⁴.

Lorsque la longueur des ARNs fut testée comme un facteur jouant un rôle dans le contrôle de qualité de l'export, le modèle avec un transcrit plus court a montré une rétention moins efficace des ARNm aberrants comparés à leur homologue plus long. Sachant que le panier nucléaire est probablement la structure où les ARNm passent le plus de temps dans ce processus de contrôle de qualité, il est suggéré que l'effet de la longueur des ARNm pourrait être lié à la configuration 3D des molécules de taille différente ⁴⁸⁻⁵⁰. En effet, dans leur simulation, les longs ARNm au niveau du panier doivent être dans une conformation plus compacte avant de pouvoir être exporté par le NPC ⁴⁸. En revanche, ces ARNm courts passent moins de temps dans le panier et atteignent le NPC plus rapidement, avec un temps de résidence estimé à 35% de moins que celui des longs

ARNm ⁴⁴. Ils en conclurent que les ARNm plus longs passent plus de temps proche du panier nucléaire pour former une structure apte à l'export, permettant à TPR de faire la différence entre les ARNm matures et aberrants.

En définitive, cette étude sur le possible mécanisme de contrôle de qualité apporte une idée sur le déroulement du processus et l'implication de TPR comme gardien de l'export ⁴⁴. Cela dit, il est important de noter qu'il s'agit d'un modèle expérimental réalisé *in silico*. Bien qu'ayant une valeur de prédiction sans démonstration expérimentale, leurs conclusions peuvent aider à orienter de futures études sur la caractérisation de ce mécanisme.

1.4. Transport des ARNs : de la transcription au panier

Les modifications du transcrit peuvent survenir co- ou post-transcriptionnellement et aident non seulement à la maturation des ARNm mais aussi à la protection contre la dégradation. Notamment l'addition de la coiffe methylguanosine en 5', l'épissage des introns, le clivage de la queue 3' ainsi que la polyadénylation sont d'importantes modifications pour la maturation des ARNm. L'implication de ces évènements s'accompagne de l'association des molécules d'ARN nouvellement synthétisées avec des protéines pour former une large particule de ribonucléoprotéines compétente à l'export (mRNP) (fig.3). Ce complexe se forme à l'aide des RBPs qui recouvrent les molécules d'ARN et organise sa structure en trois dimensions. Cet « emballage » joue un rôle important dans le niveau d'expression de gène notamment pour la formation de mRNP compétentes à l'export ³⁰.

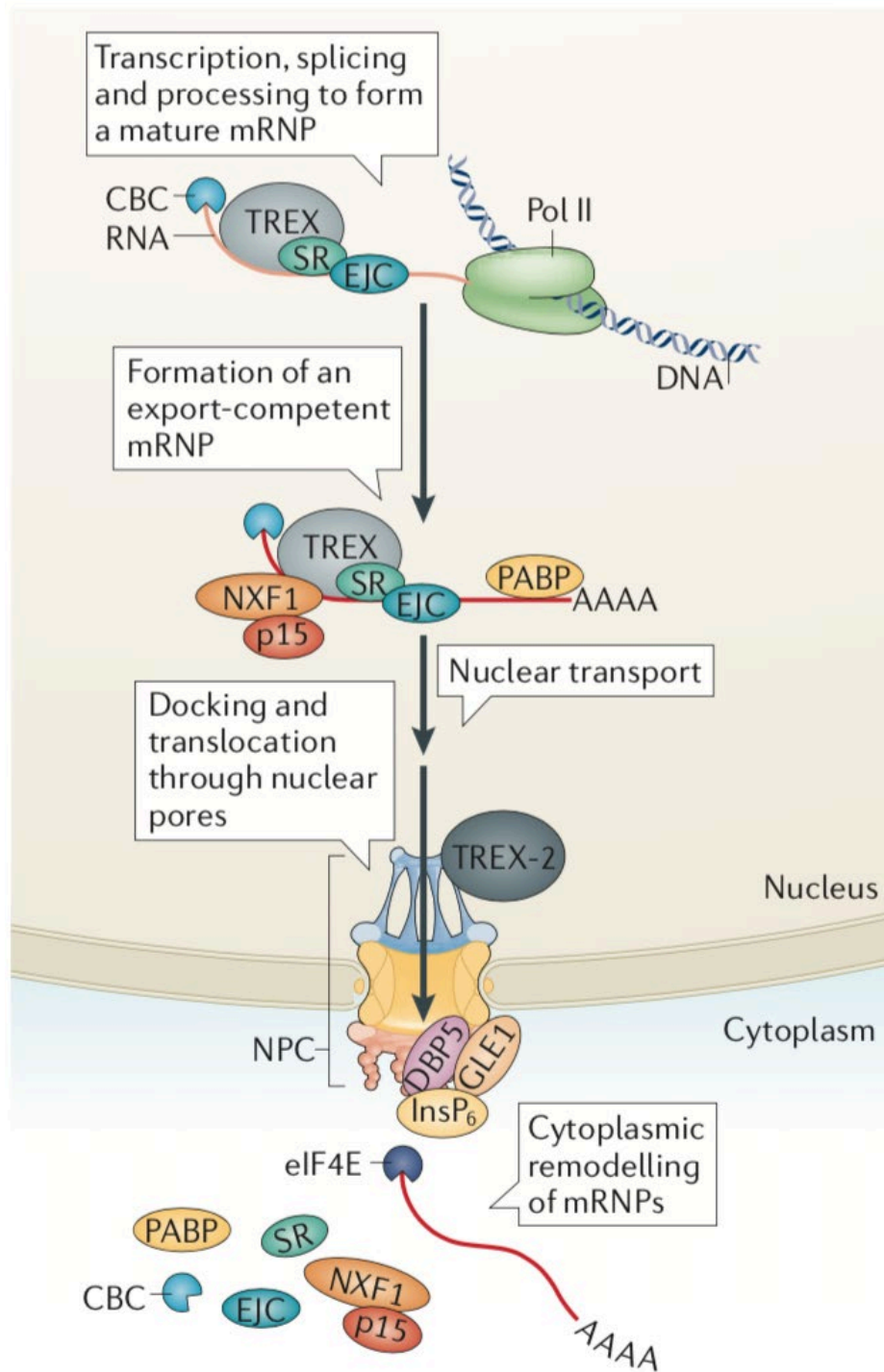


Figure 3. – Étapes de l'export des ARNm de la transcription nucléaire à l'export dans le cytoplasme.

CBC, cap-binding complex; eIF4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; EJC, exon-junction complex; InsP₆, inositol hexakis-phosphate; PABP, poly(A)-binding protein; Pol II, RNA polymerase II.

1.4.1. Épissage et maturation des ARN

L'épissage des ARNm joue un rôle important dans leur processus de maturation. Cette étape permet non seulement le retrait des introns mais également la production de plusieurs isoformes d'ARN en clivant les introns de manière alternative. Ce processus est contrôlé par le spliceosome, un complexe multiprotéique s'associant de manière séquentielle pour le retrait du fragment d'intron via la formation d'un lasso ^{35, 38, 51}. Durant la transcription de l'ARN par la polymérase II, des protéines riches en sérine (SR) sont recrutées au niveau des exons au moment du retrait d'un intron. Une fois que ce dernier est retiré, les complexes de jonction des exons (EJC) se placent adjacente à la jonction exon-exon, marquant que le pré-ARNm a été épissé ^{35, 52}. Il a été suggéré que les SR protéines ainsi que les EJCs joueraient un rôle dans l'export nucléaire, très probablement en recrutant des récepteurs d'exportation tels que NXF1. Ainsi, leur présence sur ces mRNPs est suggérée d'avoir un effet sur la structure des mRNPs en augmentant le niveau de compaction de ces particules. Ceci suggère donc un lien entre l'épissage des introns et l'export nucléaire ^{35, 52, 53}.

1.4.2. Les Facteurs Nucléaires facilitant l'export sélectif des ARNs

À la suite de leur épissage, les ARNm doivent subir des étapes de maturation afin qu'ils soient compétents pour leur transport. La présence des RBPs est importante pour l'export des mRNPs parce que la voie d'export est déterminée par la présence de certaines protéines. En effet, il a été montré que les hnRNP (heterogenous nuclear RNP), une famille de protéines nucléaires liant l'ARN, ont une fonction de triage des transcrits de l'ARN polymérase en deux classes ³⁵. En effet, au moins deux voies d'export sont possibles chez les eucaryotes. Dans le cas de snRNA (small nuclear ARN), nous avons une voie de transport dépendant de Ran-GTP via l'export médié par la karyopherin CRM1 (chromosome region maintenance protein 1). Cependant, lorsque les ARNs naissants atteignent une taille entre 150 et 250nt, les hnRNPs se lient sur ces molécules en cours de transcription ce qui mène à l'inhibition de la voie médiée par CRM1, en contraste avec

les ARNm qui utilisent une voie d'export différente, principalement celle médiée par NFX1^{35, 38, 54}.

La majorité des ARNm dépendent de la voie médiée par le facteur d'export NXF1 précédemment mentionné pour leur export. Ce facteur lie les ARNs matures et adéquatement épissés, et permet leur passage au travers la barrière de perméabilité dans le canal du pore^{30, 35, 38}. Parmi les facteurs d'export jouant un rôle important dans l'export efficace des mRNPs dans le NPC et connus pour interagir directement avec TPR, deux complexes conservés du point de vue évolutif chez les eucaryotes ont été caractérisés : les complexes **T**Ranscriptional **E**Xport Complexe TREX/THO et TREX-2^{38, 55, 56}. Initialement identifié chez la levure, le complexe de transcription export TREX/THO couple la transcription à l'export. Chez les mammifères, celui-ci est recruté durant la maturation de l'ARN, plus précisément pendant l'épissage des introns, alors que chez la levure, cela se produit de manière indépendante de l'épissage. TREX permettra par la suite le recrutement NFX1 au niveau du RNP, cependant, les détails mécanistiques sur la façon dont cela est réalisé ne sont pas entièrement compris^{35, 38, 55, 57}. Ce facteur d'export a été suggéré comme étant un acteur agissant en aval de la voie d'export des ARNm en acheminant les mRNPs au niveau du NPC^{35, 38, 57}.

Un autre complexe récemment caractérisé, soit TREX-2. Dans la levure, TREX-2 joue un rôle dans la facilitation du passage des mRNPs des sites actifs de transcription jusqu'à la périphérie nucléaire où ils rencontreront le pore via le panier pour leur export^{38, 56, 57}. Dans la cellule humaine, l'interaction avec les gènes à transcription active est moins claire, TREX-2 se trouve principalement à la périphérie du noyau, cependant, la délétion de la majorité des sous unités de TREX-2 se traduit par l'accumulation des ARNm dans le noyau. Parmi ces dernières, certaines s'associent au niveau de l'enveloppe nucléaire, dont GANP (Germinal-centre Associated Nuclear Protein). Il a été suggéré que non seulement celle-ci interagit avec NFX1 mais également qu'elle agit comme une chaperonne pour les mRNPs aux NPC^{38, 56}.

Le noyau est un environnement fortement « compartimentalisé » avec différents domaines sous nucléaires. Parmi ces derniers, il existe les Nuclear Speckles (NS) qui sont des domaines distincts des foci de transcription et qui contiennent notamment les facteurs d'épissage, les composants du complexe TREX/THO ainsi que des ARNs dit poly(A)⁺^{38, 58, 59}. Bien qu'il n'y ait

pas de consensus sur la fonction des NS dans la maturation des ARNs, des études sur TREX/THO suggèrent un possible rôle des NS dans la génération de mRNPs compétents à l'export. En effet, à la suite d'une délétion de facteurs composants TREX/THO mène à l'accumulation des ARN poly(A) dans les domaines des NS. De plus, lorsque le domaine germinal de GANP, un composant de TREX-2, est délété, des ARNs poly (A) se retrouvent dans des foci s'apparentant aux zones de transcription du génome ^{55, 59}. Ainsi, ceci suggère que les NS sont des sous-compartiments importants dans l'assemblage d'une mRNP compétente à l'export et que ces mRNPs transiteraient dans ces NS avant d'atteindre la périphérie ³⁸.

1.4.3. Transport des mRNPs à la périphérie

Lorsque les mRNPs sont prêts à être exportées, celles-ci devront transiter jusqu'à la périphérie nucléaire pour rencontrer le NPC. En effet, les mRNPs diffusent dans le noyau en passant par les zones d'interchromatine, des NS et, à la périphérie, des zones d'exclusion de l'hétérochromatine autour du NPC. Ces zones semblent être importantes pour que les mRNPs puissent atteindre le pore. Il est à noter que le transport des sites de transcription et de maturation jusqu'aux NPC est beaucoup plus long que la translocation dans le canal, qui se produit en environ 500ms ^{38, 60}.

Une fois à la périphérie, le panier nucléaire est donc la première structure que les mRNPs rencontrent. L'attachement du complexe TREX-2 sur la face nucléoplasmique du NPC dépend principalement de TPR via une interaction avec GANP, un composant essentiel du complexe TREX-2. Ceci pourrait possiblement jouer un rôle dans l'efficacité de diffusion des mRNPs au niveau du pore si ces dernières sont associées avec TREX-2. Également, des études ont montré que la présence de GANP est nécessaire aussi bien pour l'export des ARNm épissés que pour ceux provenant de gènes sans introns ^{38, 56, 61}. En effet, une des dernières étapes de l'export nucléaire des mRNPs est leur entrée dans le NPC. Ceci nécessite un transfert des ARNm cargos des complexes TREX ou TREX-2 sur le dimère d'export NFX1/NXF1T (Fig. 1(II)). En raison du changement de conformation de NFX1 médié par son interaction avec les composants de TREX, celui-ci développe une forte affinité pour les ARNm durant leur export ⁴⁶. Bien qu'il ait été montré que les cinétiques de translocations de ARNm dans le NPC sont considérablement plus rapides que leur diffusion, une étude récente suggère que le passage dans le canal prendrait environ 20ms ^{38, 62}.

Ceci implique qu'une majeure partie du temps d'export se passe au niveau des domaines périphériques du NPC, soient le panier nucléaire et les filaments cytoplasmiques. Il est intéressant de noter que plusieurs mRNPs se retrouvent au niveau du NPC puis retournent dans le nucléoplasme. En prenant en compte que seulement une petite proportion des événements d'export sont productifs, ceci suggère que l'étape limitante de l'export se passe au niveau du panier nucléaire⁶³. Cette suggestion est appuyée par la grande complexité du processus d'export des mRNPs et de l'interaction des facteurs d'export avec TPR. Ceci met ainsi l'emphase sur l'implication du panier nucléaire dans le contrôle d'accès, et en plus, un contrôle de qualité nécessaire pour permettre l'accès des mRNPs au NPC^{35, 38}.

1.4.4. Le rôle du panier nucléaire et de ses protéines d'interaction dans l'export des ARNm

Récemment, plusieurs suggestions ont été émises sur le panier nucléaire et son implication dans le contrôle qualité et l'export des ARNm. En effet, une récente étude cherchant à mieux comprendre les rôles des nucléoporines du panier nucléaire effectue une déplétion de chacune de ces NUPs afin d'identifier les altérations dans le trafic nucléocytoplasmique¹⁸. Leur système d'étude utilise le système Auxin-Induced Degron (AID) qui permet de faire la déplétion de NUPs individuelles du panier. Leur étude a montré que la déplétion de NUP153 mène à l'absence de TPR dans les nouveaux NPCs à la suite de la mitose. Ceci suggère que l'ancrage de TPR dépend de NUP153 lorsque les NPC sont formés après la mitose mais, une fois assemblée, la présence ou non de NUP153 n'affecte pas la localisation des TPR au niveau du panier¹⁸.

Par la suite, les auteurs ont étudié les profils d'ARN cellulaire par ARN-Seq à la suite de la déplétion de chaque NUP du panier (NUP50, NUP153, TPR) afin d'identifier leur rôle dans l'export des ARNm et l'expression génique en général. Les résultats montrent une altération de l'abondance des transcrits de 167 gènes à la suite d'une déplétion de TPR. De plus, des expériences d'hybridation in situ ont montré une accumulation des ARNm poly(A) dans les NS, en accord avec le rôle du TPR dans l'exportation d'au moins un sous-ensemble d'ARNm. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines liant le NPC montre également une réduction de GANP, sous-unité du complexe TREX-2 liant TPR¹⁸. Il est intéressant de noter que la déplétion de

NUP153 ne semble pas avoir cet effet sur cette sous-unité bien que cette NUP lie le complexe TREX-2. La voie d'export des ARNm médié par NXF1 est également affectée par l'absence de TPR. En prenant en compte que la déplétion de GANP affecte les ARNm poly(A) de façon similaire à celle de TPR, ces derniers ont comparé les profils d'ARN-Seq TPR, GANP et NXF1 par suite de leur déplétion et il est possible d'observer un chevauchement dans ces transcrits. Ils en concluent que TPR jouerait un rôle au niveau de NPC pour faciliter l'export des ARNm dépendants de TREX-2 et NXF1 ¹⁸. Ainsi, les résultats de cette expérience suggèrent que seul TPR est nécessaire pour le recrutement de GANP de TREX-2 au niveau du NPC. Les auteurs suggèrent que la précédente interaction de NUP153 avec TREX-2 serait due à son rôle dans la localisation de TPR au niveau du NPC suite à la mitose ¹⁸.

1.4.5. Sélectivité de l'export des ARNm

La maturation adéquate des ARNm joue un rôle important dans leur export car la présence d'un intron peut représenter un signal de rétention de cet ARN. Ceci a été observé pour plusieurs ARNm de différents gènes et lorsqu'on étudie le lien entre cette rétention et l'export, une connexion semble exister entre le panier nucléaire et cette rétention ⁶⁴. Cette suggestion est appuyée par la fuite des ARNm contenant des introns ou dont la maturation est incomplète par suite d'une délétion de TPR.

Parmi ces études réalisées sur TPR, une équipe a cherché à identifier le rôle de TPR dans la régulation de l'export nucléaire des ARNm et des longs ARNs non codant (lncARN). Ces derniers ont étudié les niveaux d'expression de ces transcrits à la suite d'une déplétion de TPR en utilisant des motifs de site d'épissage 5' ^{65, 66}. Dans un premier temps, ils observent que TPR n'est pas impliquée dans la rétention des ARNs contenant ce motif, cela dit, sa déplétion affecte la stabilité des ARNs, et leur taux d'export. En effet, une fraction de leurs transcrits sont dirigés vers la dégradation en absence de TPR. Cependant, lorsqu'ils analysent l'effet de la déplétion de TPR sur les transcrits de gènes sans introns, ils observent que ces derniers sont fortement retenus dans le noyau. Ce phénotype est illustré par les ARNm des histones qui sont naturellement sans introns ⁶⁴. Il est intéressant de noter qu'ils n'ont pas observé une augmentation du nombre d'ARNm non épissés dans le cytoplasme. Ils suggèrent donc que TPR ne serait pas impliquée dans la rétention

des ARNm non épissés mais plutôt que cette protéine régule l'export de certains ARNm et lncARNs ⁶⁴.

À la suite d'une analyse des différents ARNm affectés par la déplétion de TPR, les résultats de leurs expériences subséquentes suggèrent que les ARNm produits de gènes contenant très peu ou pas d'introns sont celles dépendant de TPR pour leur export. Une accumulation des ARNm dans les NS est un phénotype pouvant être observé dans leur expérience, suggérant un possible rôle de TPR dans la libération de ces transcrits avant leur export ⁶⁴. Également, une de leur suggestion est que TPR lierait tous les ARNm durant l'export possiblement pour médier la maturation des RNPs. Cela dit, cette implication de TPR ne serait que pour ces ARNm de gènes contenant un faible nombre d'introns. En définitive, cette étude met l'accent sur la possible implication de TPR dans différents mécanismes de maturation des mRNPs notamment dans son rôle régulateur dans l'export nucléaire ⁶⁴.

1.5. Approche de microscopie – Single Molecule Tracking

1.5.1. Microscopie à molécule unique sur cellules vivantes

Aux cours des dernières années, plusieurs avancées ont été faites en termes d'approches de microscopie. La microscopie à fluorescence notamment, représente une méthode importante dans l'analyse de composants organique dans les cellules vivantes, ce qui donc permet de suivre une protéine à l'aide d'un fluorophore organique rajouté à la protéine d'intérêt et d'identifier leur localisation. À l'aide des avancées de la microscopie à fluorescence et l'accès à des fluorophores divers, dont ceux qui peuvent être activés, la méthode d'imagerie pour un suivi de molécules uniques a été mise en place en association avec la technique de *Single Molecule Tracking* (SMT). Bien que le SMT existe depuis plusieurs années, l'utilisation de cette technique dans des cellules vivantes est principalement due à la microscopie à fluorescence ⁶⁷. La création d'étiquettes fluorescentes et leur optimisation, comme le HaloTag par exemple, jouent un rôle important dans l'optimisation du SMT. Le HaloTag est un système de marquage de protéines est un marqueur pouvant interagir avec des ligands synthétiques en formant un lien covalent ⁶⁸. Ceci présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes de marquage de protéines traditionnels car différents

ligands HaloTag peuvent être utilisés pour étudier différents aspects de la protéine d'intérêt, nécessitant ainsi une seule construction de gène^{68 69}. De plus, la liaison des protéines HaloTag aux ligands HaloTag est rapide et irréversible, permettant des expériences de marquage séquentiel pour analyser la synthèse et la dégradation des protéines. Également, cette technique de marquage peut être utilisée pour l'imagerie cellulaire de cellules vivantes et fixes en raison de la stabilité et de la résistance du complexe HaloTag^{69 70}.

Cependant, certains désavantages se présentent avec cette technique, notamment la limite de résolution, qui est de 250nm. En effet, plusieurs des systèmes étudiés sont de taille inférieure à cette limite. De plus, en raison des concentrations diverses des protéines dans les cellules, la caractérisation de la dynamique de protéines abondantes n'est pas faisable en utilisant uniquement la microscopie à fluorescence. Pour remédier à ces limitations qui se présentent, plusieurs techniques ont été mises en place au cours des dernières années qui permettent de réduire les contraintes de résolution, qui sont les techniques de microscopie à super résolution. Celles-ci viennent avec des aspects avantageux, notamment la préservation et le ciblage spécifique de l'échantillon d'intérêt, mais également, la possibilité de faire une analyse quantitative des molécules présentes dans différents compartiments cellulaires et leur distribution spatiale. Ainsi, pour l'étude d'une protéine dynamique dans le noyau, ces techniques de microscopie représentent un outil essentiel^{67 71 72}.

Pour l'étude de notre protéine d'intérêt, les techniques de SRM (Super Resolution Microscopy) sont celles qui semblent le plus avantageuses pour la caractérisation de TPR. Nous avons donc choisi de mettre en place un protocole d'acquisition qui nous permettrait d'avoir une bonne qualité d'images qui pourront être utilisées ultérieurement pour une analyse plus poussée. Alors, en plus de la SRM, nous utiliserons la méthode dite *Total Internal Reflection Fluorescence* (TIRF) en association avec l'illumination *Highly Inclined and Laminated Optical sheet* (HILO). Le TIRF est une méthode en microscopie qui permet de générer un motif d'illumination dont la pénétration dans l'échantillon est limitée à environ 200nm, ce qui mène à une réduction du bruit de fond lié au plan hors focus. Ceci permet donc l'observation de molécules uniques à la surface des cellules^{71 73}. Cependant, vu que cette méthode n'est limitée qu'aux surfaces cellulaires, nous utilisons la microscopie en HILO, qui illumine l'échantillon d'intérêt dans un angle spécifique pour qu'un seul plan Z soit illuminé⁷⁴. Cette technique permet d'avoir

un meilleur ratio du signal sur le bruit de fond, et ce ratio peut être optimisé par l'utilisation de fluorophores activables et est réalisé en aval d'un microscope dans la même disposition que le TIRF ⁷³. En définitive, notre approche de microscopie déterminera la méthode d'analyse des images pour extraire les données nécessaires pour leur quantification. La méthode SMT mentionnée plus haut a été mise en place depuis plusieurs années et son association avec le HILO pourrait nous aider à mieux caractériser les populations de TPR.

1.5.2. Méthode d'analyse - SMT

Lorsqu'une approche SMT est réalisée, les résultats sont obtenus sous forme de milliers d'images prises consécutivement dans le temps à des intervalles réguliers et établis selon le type d'étude à entreprendre. L'étape suivante est donc d'utiliser ces images comme sources des paramètres à extraire pour la caractérisation des potentielles populations. Plusieurs méthodes et logiciels sont utilisés pour le traitement des données et le choix est important selon la présentation des données et le type d'analyse et de caractéristiques ciblées ^{67 71}.

Pour des molécules comme TPR qui diffusent dans nucléoplasme et qui peuvent être observées sur plusieurs cadres d'images, nous avons choisi d'utiliser le logiciel TrackMate, une extension de Fiji. Ce dernier permet d'analyser les données obtenues de la microscopie sous forme de trajectoires, à l'aide de fonctionnalités permettant de personnaliser la sensibilité de la détection des particules, les attribues considérées des particules et le logarithme d'analyse pertinent pour notre étude. Ensuite, le traitement des images permet d'obtenir les trajectoires de la série d'images analysée et des données contenant les paramètres nécessaires pour une analyse plus poussée. Pour le traitement des données de TrackMate, le logiciel MATLAB sera utilisé avec l'aide d'un script préalablement définie pour une analyse SMT ⁷⁵. En effet, certains paramètres sont essentiels pour être capable de caractériser différentes populations d'une protéine ⁷⁶. Souvent, dans le cas de molécules biologiques comme des protéines, les principales caractéristiques étudiées sont le coefficient de diffusion, le type de mouvement de trajectoire, le confinement de la molécule ainsi que de la distribution.

Le coefficient de diffusion est un paramètre indispensable dans une analyse de dynamique de protéine, et permet d'identifier le type de molécule observé selon les valeurs obtenues. Ce

dernier dépend du *Mean Square Displacement* (MSD), qui est également un des paramètres déterminant le type de mouvement d'une molécule. Puisque nous analysons une protéine, nous utiliserons les valeurs de différentes protéines et macromolécules pour définir nos références de coefficient de diffusion métaboliquement pertinentes. Plusieurs études sur des protéines en diffusion libre dans le noyau suggère que ces dernières ont généralement un coefficient de diffusion $D_f > 1$. Cependant, plusieurs études ont tenté d'identifier un coefficient de diffusion qui correspondrait à celui des ARNs et des mRNPs, néanmoins, il y a encore plusieurs différences dans les coefficients de diffusion présentés ⁷⁵. Par exemple, une étude sur mRNP Beta-Actin dans des cellules HeLa suggère que le coefficient de diffusion de ce complexe serait entre $0.74 - 0.58 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.4$, selon le compartiment cellulaire où il diffuse ⁷⁷. Cependant, une étude utilisant différents ARNm représente des coefficients de diffusion dans l'ordre du $0.01-0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Table 1 Summary of the measured diffusion coefficients for the various mRNAs in the nucleus and the cytoplasm						
mRNA transcript	Average D_{nuc} ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	Maximum D_{nuc} ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	Average D_{cyt} ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	Maximum D_{cyt} ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	Calculated t_{nc} (min)	Measured t_{nc} from live-cell movies (min)
E1	0.023	0.057	0.022	0.045	3.0–7.7	5
E3	0.010	0.024	0.017	0.037	6.9–17.6	20
E6	0.009	0.016	0.011	0.023	8.1–20.6	15–20
½-Mini-Dys	0.004	0.013	0.010	0.027	16.8–43.1	30
½-Mini-Dys + intron	0.005	0.012	0.006	0.020	14.8–37.9	30
Mini-Dys	0.005	0.011	0.008	0.014	13.2–33.7	30–40
Full Dys	0.005	0.012	0.007	0.016	13.9–35.6	30–40

The average D_{nuc} values were used to calculate the travel time through a nucleus with a radius of 5–8 μm . D_{nuc} , nuclear diffusion coefficient; D_{cyt} , cytoplasmic diffusion coefficient; t_{nc} , nucleo-cytoplasmic translocation time.

Figure 4. – Différents coefficients de diffusion reportés dans des cellules humaines. ⁷⁸

Lorsque les dynamiques de translocations sont analysées, une équipe suggère que le coefficient de diffusion sera entre $0.2 - 0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dans les cellules U2OS, ce coefficient de diffusion serait de $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$. En prenant en compte toutes ces différentes valeurs, nous avons défini un intervalle de coefficient de diffusion que nous considérerons comme référence pour une potentielle interaction avec un ARN ou mRNP. Ceci reste encore une estimation et le coefficient de diffusion de TPR n'est pas encore défini pour sa fraction nucléoplasmique.

Le MSD représente le paramètre permettant de déterminer le type de mouvement que la trajectoire analysée présente. Cette valeur est dépendante du délai de la trajectoire mais possède

aussi le coefficient de diffusion comme fonction; ces paramètres sont définis de la manière suivante :

$$\text{MSD} = 2nD_t^\alpha$$

D = Coefficient de diffusion

n = Dimension

t = Délai (s)

α = Composant de mise à l'échelle

Cette équation est représentée en courbe pour la classification des trajectoires basées sur leur valeur alpha. Alors, pour une $\alpha = 1$, nous avons les molécules en diffusion, les trajectoires dans cette catégorie sont en diffusion libre et peuvent avoir un coefficient de diffusion varié. Lorsque α est inférieur 1, cela correspond au mouvement confiné, elles ont généralement un coefficient de diffusion en dessous de 1 mais peuvent aussi être plus longue. Enfin, quand α est supérieur à 1, le type de mouvement est dit facilité ou dirigé. Ceci pourrait correspondre aux protéines en circulation dans le noyau ou à un complexe ayant une fonction. Ainsi, notre méthode d'analyse se basera principalement sur ces outils décrits ci-dessus ⁷⁵.

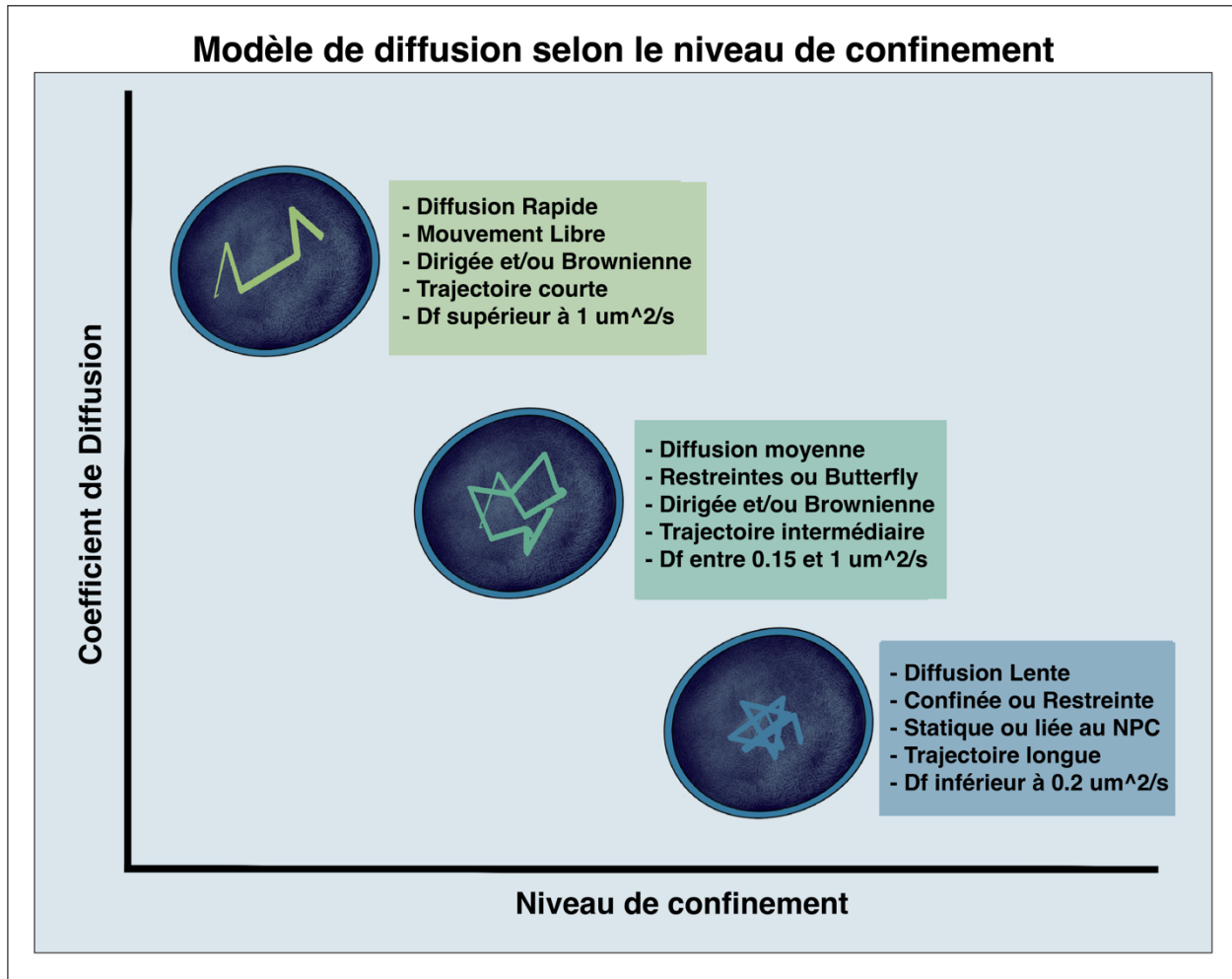


Figure 5. – Modélisation des types de trajectoires selon le coefficient de diffusion et le niveau de confinement.

Les trajectoires sont divisées en différents groupes selon leurs caractéristiques (Taille, niveau de confinement, coefficient de diffusion). Les catégories sont discriminées selon le modèle décrit dans Lerner et al ⁷⁵.

2. Objectifs et hypothèse

Le panier nucléaire a été décrit comme étant le gardien du complexe de pore nucléaire, sachant que les molécules sortant du noyau doivent impérativement passer à travers le panier avant de pouvoir entrer dans le NPC. Des études utilisant le large mRNP Balbiani Ring ont montré que les mRNP se lient en amont du panier, et se réarrangent pour entrer dans NPC, plaçant donc le panier comme un élément central dans l'export des ARNm. TPR est la composante structurale du panier, illustré par l'absence de la structure du panier lorsque TPR est déplété. TPR interagit également avec le facteur d'export des ARNm, NFX1, ainsi que le complexe TREX-2, supportant le rôle de TPR et du panier comme plateforme d'interaction pour les mRNP régulant l'entrée dans le NPC. Cependant, malgré sa position comme élément centrale dans l'ancrage nucléaire au NPC, TPR n'est pas uniquement localisée au pore, mais montre aussi une fraction nucléoplasmique significative. La fonction de TPR nucléoplasmique est cependant non déterminée. Plusieurs autres nucléoporines du panier interagissent avec la chromatine, et sont possiblement impliquées dans la régulation de la transcription. Également, dans la levure, Mlp1/2 interagit de façon dynamique avec le NPC, et cette interaction avec le NPC est liée à la transcription et la maturation des mRNPs.

En effet, malgré plusieurs études menées dans le but de mieux comprendre comme le panier nucléaire interagit dans le noyau, plus particulièrement au niveau du métabolisme des ARNs, un consensus n'a pas encore été atteint. Récemment, une analyse de la déplétion des nucléoporines composant le panier nucléaire suggère que la fonction de TPR n'est pas compensée par NUP153 et NUP50. En absence de cette dernière, plus de 70% des mRNPs arrivant vers la périphérie ne parviennent pas à arrimer au niveau du panier, suggérant ainsi que cette fonction est propre à TPR. De plus, cette équipe note une différence dans le trajet d'export des mRNPs liée à l'absence de TPR. En prenant en compte tous leurs résultats, ceux-ci appuient l'implication de TPR dans le contrôle de qualité de l'export mais également la rétention des ARNm non épissés. Il est également important de noter que bien que ces fonctions aient pu être montrées, il n'est toujours pas clair si TPR joue un rôle clé dans l'arrimage et si cette étape est limitante pour le succès de l'export des mRNPs ¹⁸.

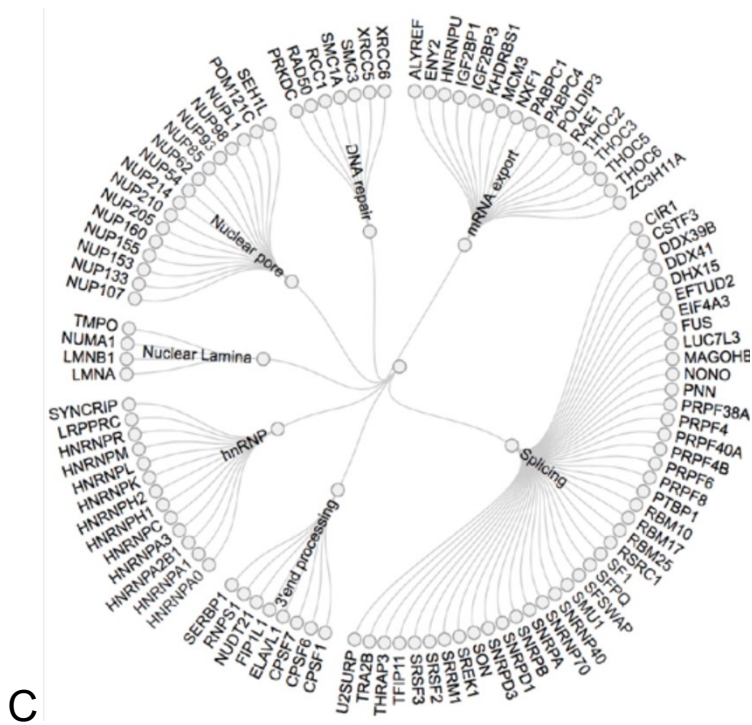
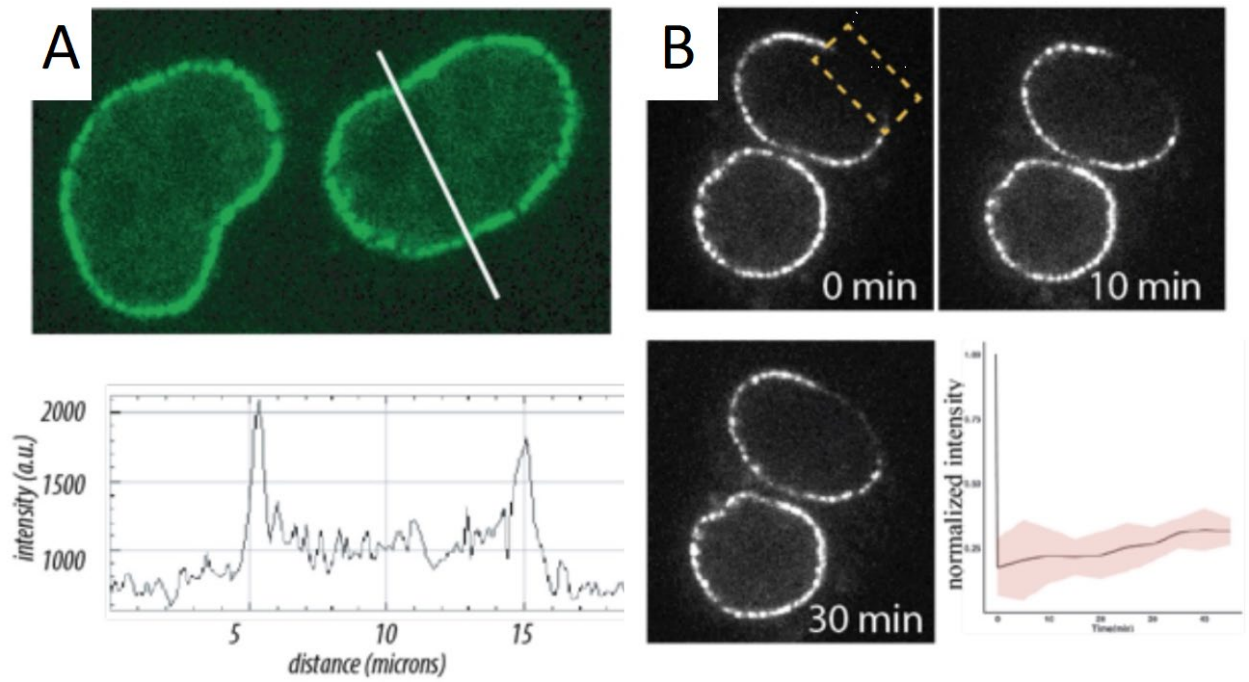


Figure 6. – (A) Coupe confocal de cellules HEK TPR-GFP acquise par microscopie à disque rotatif.

Le diagramme plus bas montre l'intensité à travers la ligne illustrée ci-dessus. (B) Recouvrement FRAP de TPR-GFP. (C) Interactome des complexes en association avec TPR. Une purification par affinité en utilisant des nanocorps anti-GFP a permis d'isoler l'interactome de TPR, suivi par une par spectrométrie de masse. L'enrichissement des protéines des NPC, hnRNP, d'épissage et de dommages d'ADN est illustré dans le cercle dendrographique. (Données obtenues par Dr. Pierre Bensidoun)

Comme mentionné ci-dessus, il existe une population de TPR dans le nucléoplasme indépendant de celle ancrée au niveau du NPC. Sachant que NPC-TPR n'est pas en association dynamique avec le pore, la fraction nucléoplasmique pourrait être impliquée dans différents mécanismes nucléaires. En concordance avec un tel modèle, les protéines retrouvées dans nos résultats préliminaires (Fig.6b) de l'interactome de TPR purifiée par affinité et analysée par spectrométrie de masse suggèrent qu'une fraction nucléoplasmique jouerait un rôle dans la voie de maturation des mRNPs. Ainsi, nous avons pour hypothèse que la population de TPR dans le nucléoplasme aurait des fonctions distinctes de celle liée au NPC. Pour tester cette hypothèse, nous analyserons la dynamique des deux populations de TPR via une approche d'imagerie, ainsi que l'interactome à la suite d'une purification sélective de chaque population.

De plus, nous cherchons à mieux comprendre comment le panier nucléaire fonctionne en donnant accès au mRNP au niveau du pore. On peut postuler que comme dans le canal central du pore, un micro-environnement pourrait être créé par le panier nucléaire afin de trier les mRNPs devant être exportées. En effet, de façon similaire à l'exclusion de la chromatine par TPR, le panier serait capable d'exclure certaines protéines associées à l'ARN en les désignant comme immatures. Une analyse précise de colocalisation par microscopie permettra de tester si certains facteurs liant les mRNPs ne devant pas être exportés sont systématiquement exclus du micro-environnement du panier.

3. Matériels et méthodes

3.1. Construction des plasmides

Le plasmide TPR-Halo est dérivé du plasmide TPR-GFP précédemment construit dans le laboratoire. Il contient une résistance pour l'Ampicilline, et deux bras homologues codant pour une séquence de TPR. Une mutation a été placée à l'ATG du premier exon. La séquence codant pour HaloTag est ajoutée au niveau N-terminus de TPR avec une ligation à la suite d'une digestion avec les enzymes de restrictions EagI et BsmBI. Le plasmide ARNg-Cas9 contient une résistance pour l'ampicilline et pour la puromycine.

3.2. Culture cellulaire et transfection

Des cellules HEK293FT ont été utilisées pour toute l'étude. La lignée est maintenue en culture dans un milieu DMEM (Winsent) contenant 10% de sérum de bovin fœtal (Winsent) maintenant dans un incubateur à 37 °C à une atmosphère contenant 5% de CO². Les cellules sont passées 24h pour une confluence de 1 :5 avant la transfection avec le vecteur 849 contenant TPR-Halo et le 826 contenant l'ARNg et la Cas9 avec la lipofectamine 3000 pour un ratio (1 :2) respectivement. Après 48h, le milieu est remplacé avec un DMEM + 10% FBS + 2ug/mL de puromycine pour 2 jours. Les cellules vivantes sont passées et transférées dans un pétri de 10cm pour la remise en culture et environ 100,000 sont placées sur un pétri à fond en verre pour observer au microscope confocal à disque rotatif. Après confirmation de la présence de cellules positives, les cellules sont préparées pour la sélection par Cytométrie en Flux. 1M de cellules sont en premier traitées avec 10nM du ligand JF549 (Janelia) pendant 30 minutes et trois lavages de 15 minutes sont effectués. Ensuite, après un rinçage avec du PBS froid, un milieu de PBS avec 10% de FBS est rajouté dans le pétri et les cellules sont collectées avec une raclette. Les cellules sont sélectionnées pour un fort signal du ligand JF549 en maintenant le nombre de cellules restreint. À la suite de la sélection au FACS, les cellules sont récoltées et placées dans le milieu DMEM + 10% FBS avec une concentration de 5ng/ml de Gentamycine. Les cellules, une fois à une quantité adéquate, sont congelés à l'ordre de 4 millions/mL dans un milieu contenant DMEM + 10% FBS + 10% DMSO. Les cellules en culture sont observées au microscope confocal pour confirmer que la population de cellules positives est satisfaisante.

3.3. Immunofluorescence avec HaloTag :

80-100 milles cellules TPR-Halo sont passées dans un pétri à 12 puits contenant des lamelles préalablement traitées avec 0.01% de Poly L-Lysine + PBS et séchées. Après 24h, les cellules sont marquées avec 10nM de JF549 pendant 30 minutes, suivi d'un rinçage, 2 lavages de 15 minutes et un lavage de 30 minutes avec du milieu de culture. Ensuite, 3 puits sont traités avec 100nM de DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside), inhibiteur de l'ARN polymérase II, ajouté au milieu pendant respectivement 30min, 1h, et 2h. Après l'incubation, tous les puits sont immédiatement fixés avec 4% de PFA + PBS pendant 10min suivi de 3 lavages de 10min. Nous ajoutons du Hoechst pour une concentration de 1:2000 suivi de 3 lavages avec PBS de 10min. Les lamelles sont enfin placées sur une lame de microscopie avec du Mounting Media et laissées au repos pendant 24h avant l'imagerie. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal droit, soit le Olympus Fluoview FV300. Les lasers utilisés sont respectivement 405nm pour le Hoechst à 5% de puissance et 20ms de temps d'exposition, et 561nm pour le ligand JF549 à 50% de puissance et 50ms de temps d'exposition. Les images sont prises sur le plan Z, avec 0.24 μ m pour un total de 10 images par piles. Nous avons utilisé l'objectif 60x/1,40, Plan Apochromat BFP1 C2, DIC, 0,17 mm, immersion à l'huile.

3.4. Microscopie en cellules vivantes

Les cellules sont passées dans un pétri à fond en verre la veille de la prise d'images pour environ 200-300 milles cellules. Le microscope utilisé est un confocal à disque rotatif Zeiss Axio-Observer Z1, la température de la cabine d'incubation est maintenue à 37 °C et les CO² à 5% au moins 15min avant le début de l'expérience. Les cellules sont traitées avec 20nM de JF549 pendant 30min suivi de 2 lavages de 15min et un lavage de 30min. Pour les cellules contrôles, nous rajoutons le milieu de DMEM + 10% FBS et commençons la mise en place de l'expérience. Nous utilisons le laser 561nm à 100% pour 50% de temps d'exposition, de plus, plusieurs régions sont sélectionnées en pile et mises en focus pour réaliser une série dans le temps. La prise des images se fait chaque 10min aux différentes régions sélectionnées pendant 1h. Pour les cellules contenant l'inhibiteur de la transcription, nous rajoutons 100nM de DRB et mettons en place les régions en pile et le focus pour un suivi de 2h de temps, une image chaque 10min. Les paramètres sont les

mêmes que pour le contrôle. L'objectif utilisé est le 63x/1,46, alpha Plan-Apochromat korr M27 TIRF, 0,17 mm; WD 0,10 mm; immersion à l'huile (Zeiss 420780-9970-000).

3.5. Microscopie à molécule unique

Pour la microscopie dans une condition sous-stœchiométrique de marquage du ligand, nous plaçons 100-200 milles cellules TPR-Halo la veille de la prise des images. Le lendemain, elles sont marquées avec 5nM de JF549 pendant 30min, d'un rinçage, de 2 lavages de 15min et d'un lavage 45min. Ensuite, nous retirons le milieu du dernier lavage et rajoutons 1ml de DMEM + 10 FBS. Nous utilisons un microscope à super résolution SR-SIM et PALM 3D, Zeiss Elyra PS.1. Pour cette acquisition, nous utilisons le détecteur SR-SIM (EMCCD iXon3 DU-885K CSO VP461 d'Andor) ainsi que l'objectif 63x/1.4 à huile d'immersion. Le protocole d'imagerie que nous utilisons est celui d'ultra-power TIRF avec HILO. Le laser est le 561nm que nous utilisons à 1% à 15ms pour le focus et le choix du temps, et une fois le temps sélectionné, nous augmentons la puissance du laser à 10% pendant 3sec pour réduire le nombre de molécules fluorescentes. Premièrement, nous prenons une série dans le temps de 10,000 images avec le laser à 5% et le temps d'exposition à 10.3ms pour un champ de 48x48. À la fin de cette série, nous prenons les mêmes cellules pour la même acquisition, mais le laser est à 2% et le temps d'exposition de 20ms. Ce processus est répété jusqu'à l'obtention d'un nombre d'images adéquat pour une analyse.

3.6. Suivi de molécule unique

Pour l'utilisation des paJF549, la préparation des cellules est similaire pour la veille. Le jour de l'expérience, les cellules sont marquées avec 250nM de paJF549 fraîchement sortie du congélateur -80 °C. Une fois le ligand rajouté au milieu, les cellules sont placées dans l'incubateur et protégées de la lumière jusqu'à l'arrivée au microscope. Le même processus de lavage et rinçage est répété en s'assurant d'éviter la lumière et les cellules sont ensuite placées dans une boîte isolant la lumière pour le transport au microscope. Dans le cas des cellules avec l'inhibiteur de la transcription, le même processus est répété jusqu'au rinçage et le milieu ajoutée en dernier contient 100nM de DRB. Pour l'acquisition dans ce cas, nous utilisons le même système et protocole précédemment décrit, à l'exception de l'ajout du laser 405nm comme activateur de paJF549, qui est utilisé principalement pour la pile des images, à environ 0.001-0.01%. Le laser 561 est utilisé

à 1% pour la détection des cellules. Avant la prise de la série d'images, les particules déjà activées subissent un photoblanchiment avec 5% du laser 561nm. L'acquisition peut ensuite débuter avec un temps d'exposition de 10.3ms et 20ms. Pour ces images, nous en obtenons au moins 25 avant de pouvoir entreprendre l'analyse des données. Les cellules sont généralement imagées pendant 60-80min avant le remplacement du pétri.

3.7. Analyse des données avec Fiji-TrackMate

Les images obtenues de la microscopie à molécules uniques sont ouvertes avec Fiji pour déterminer la qualité de détection. Lorsque l'une d'entre elles est satisfaisante, nous choisissons la zone de noyau où nous souhaitons que la détection de trajectoires se produise, périphérie nucléaire en excluant l'enveloppe et le cytoplasme. Une fois la zone sélectionnée, nous choisissons les paramètres de la détection avec le logiciel TrackMate. Nous utilisons le détecteur utilisant la différence des gaussiennes, optimale pour les petites particules. La taille des particules est de 0.8nm et nous attribuons une valeur numérique de l'intensité de détection est de 15-20 pour avoir moins de 10 spots par image à la suite de la détection. Le nombre de spots obtenus n'est pas filtré, nous continuons immédiatement avec la détection des trajectoires. Pour cette étape, nous utilisons le LAP Tracker, qui permet de choisir la distance maximale d'interaction que nous attribuons à un saut de la particule d'une image à l'autre, qui dans notre analyse est de 0.8nm, le nombre maximum pour fermer un saut qui de 2 pour les images. Lorsque les trajectoires sont générées, nous filtrons selon leur longueur pour avoir un minimum de 5 points par trajectoires. Nous réalisons d'autres étapes de filtration comme la qualité ainsi que le ratio de confinement. Nous obtenons alors 3 types de données XML pour une image : les trajectoires complètes, les trajectoires dont le confinement est en dessous de 0.15 et celles dont le ratio est au-delà de 0.15. Ces fichiers seront ensuite traités et analysés avec le protocole de SMT sur MATLAB.

Analyse MATLAB : Le protocole que nous avons utilisé a été décrit dans le papier joint :

<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100223>

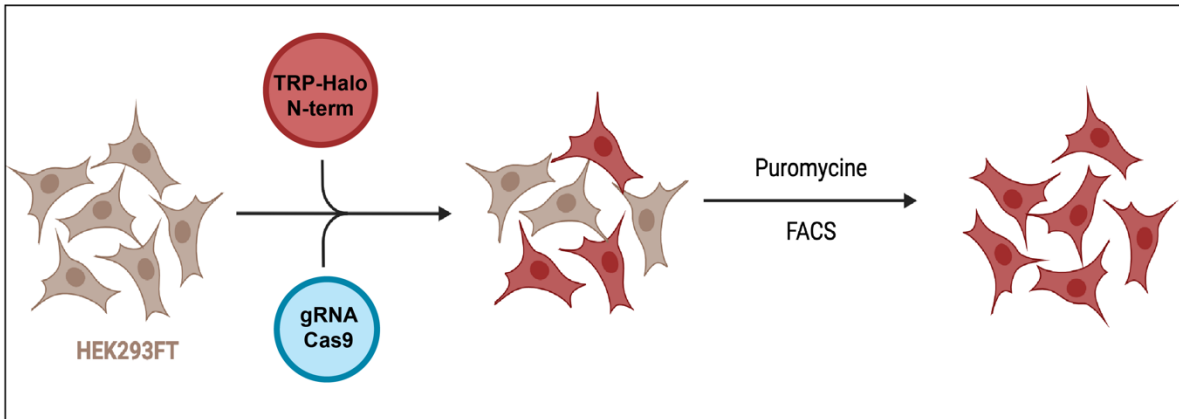
4. Résultats

4.1. Mise en place d'une approche de microscopie pour étudier les dynamiques de TPR au niveau des molécules uniques en cellule vivante

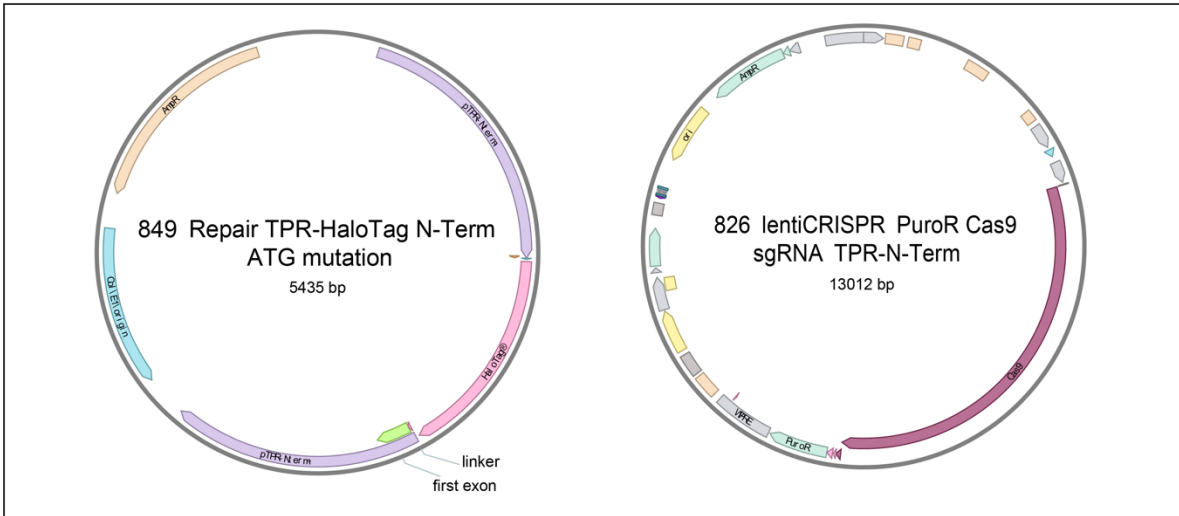
4.1.1. TPR est présente dans le noyau en deux fractions

La protéine TPR est la composante structurale principale du panier nucléaire, présente de l'ordre de 8 copies par NPC, et interagit avec différentes protéines impliquées dans l'export des ARN. Cependant, il a été montré récemment qu'il existe une sous-population de cette protéine dans le nucléoplasme qui ne semble pas être liée aux NPC. De plus, notre investigation protéomique préliminaire des protéines interagissant avec TPR montre que plusieurs protéines impliquées dans la maturation des ARN sont co-purifiées avec TPR. Ceci suggère alors que TPR pourrait s'associer avec des ARNm dans les étapes précoces de la voie d'expression génique. Par conséquent, TPR aurait potentiellement une fonction au-delà de son rôle d'échafaudage structural du panier nucléaire. Cependant, il est encore inconnu si les TPR nucléoplasmiques reflètent effectivement les molécules de TPR s'associant aux ARNm dans le nucléoplasme, ou même plutôt lors de la transcription, et les différentes fonctions possibles de TPR sont encore mal caractérisées. Pour mieux comprendre les fonctions nucléoplasmiques possibles de TPR, nous avons donc cherché à établir une approche basée sur la microscopie qui nous permettrait de mesurer le comportement des molécules TPR uniques dans les cellules vivantes et d'utiliser son profil de diffusion dans différentes conditions comme proxy pour déduire les fonctions possibles de TPR nucléoplasmique. Pour y parvenir, nous avons d'abord dû établir une lignée cellulaire exprimant le TPR marqué par fluorescence qui est suffisamment brillant pour être détecté comme une seule molécule.

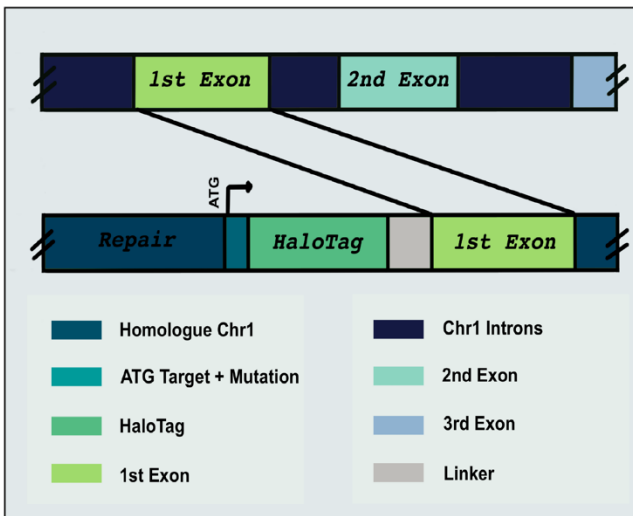
A. Transfection de cellules HEK293FT via CRISPR/Cas9



B. Plasmide vecteur TPR-repair et ARNg Cas9



C. Construction TPR-Halo + mutation ATG



D. TPR-Halo HEK293FT -15nM JF549

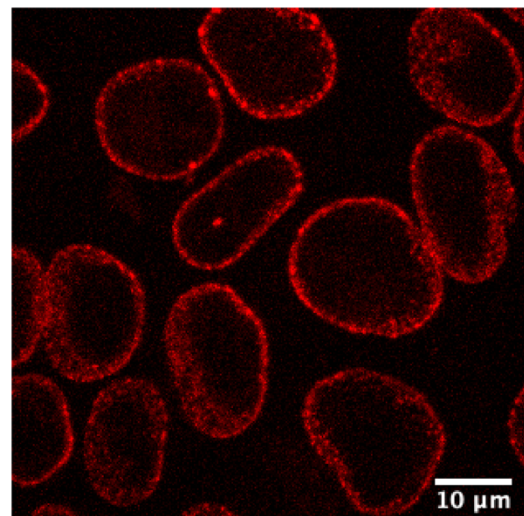


Figure 7. – Schéma de la construction de la lignée cellulaire HEK293FT - TPR-Halo.

(A) Les cellules HEK293FT sont transfectées avec le vecteur contenant la séquence recombinante de TPR et avec le plasmide ARNg + Cas9. (B) Construction des plasmides, le plasmide 849 contient la séquence recombinante de TPR avec le Halo-Tag et le plasmide 826 possède l'ARNg ainsi que la séquence de la protéine Cas9. (C) Une mutation ATG est insérée en amont du 1er exon dans la séquence homologue du vecteur TPR-Halo. (D) Les cellules TPR-Halo ont été marquées avec 15nM du ligand JF549 et les images ont été prises à l'aide du microscope confocal à disque rotatif.

Pour analyser la distribution de la sous population de TPR non-associée aux pores, nous avons décidé de créer une lignée cellulaire exprimant un TPR endogène avec le système de marquage HaloTag en utilisant la méthode de modification génique CRISPR-Cas9⁷⁹. Le système HaloTag a été utilisé pour notre étude en raison du choix de ligand fluorophore et de la versatilité de son utilisation (fig. 7). Effectivement les Halo-tag sont des étiquettes exprimées en fusion avec nos protéines d'intérêts, dans notre cas, TPR.⁶⁹

Ces étiquettes sont capables de lier de façon covalente des ligands, notamment ceux JF (Janelia Fluor), des colorants organiques émettant plus de photons que les protéines fluorescentes traditionnellement utilisées en microscopie et sont moins sensibles au photoblanchiment, permettant ainsi de détecter de façon prolongée des molécules uniques. Les membranes cellulaires sont perméables à ces colorants organiques qui seront donc incubés dans le milieu de culture⁸⁰. Ceci présente un atout important lors du marquage d'une protéine nucléaire, tel que TPR.

L'obtention de la lignée cellulaire TPR-Halo requiert la création de deux plasmides, dont l'un exprimant l'ARNg et un deuxième pour l'expression du fragment recombinant intégrant la séquence du HaloTag dans le cadre de lecture au niveau N-terminale de TPR. Ainsi, nous avons créé le plasmide vecteur contenant la séquence recombinante de TPR avec HaloTag, placée en amont du premier exon du gène de la protéine et du codon ATG (Fig.7b 7c). De plus, une mutation ponctuelle est rajoutée à la séquence au niveau du ATG pour empêcher une coupure double de l'ARNg après que la séquence recombinante contenant le HaloTag ne soit insérée. Ensuite, nous avons créé le plasmide contenant la Cas9 ainsi que l'ARNg, exprimé à l'aide du promoteur EF-1 α . Ce plasmide contient également une résistance pour la puromycine, un antibiotique inhibant la synthèse des protéines, qui servira de marqueur de sélection de la transfection.

Les plasmides ont été alors transfectés dans des cellules HEK293FT en culture avec l'agent lipofectamine 3000 et laissés en cultures pendant 2 jours. À la suite de la réaction de transfection, ces cellules sont traitées avec la puromycine pendant 48h afin de sélectionner les clones positifs pour notre lignée cellulaire. Ceci provoque la sélection négative des cellules n'ayant pas de résistance pour l'antibiotique et par conséquent, celles qui n'ont pas été transfectées. Ensuite, les clones survivants ont été remis en culture et une partie est placée dans un pétri à fond en verre pour évaluer l'efficacité de la réaction CRISPR-Cas9. Les cellules sont préalablement marquées avec 20nM du ligand JF549 pour la fluorescence ont montré un rendement d'intégration de 20% après la sélection à l'aide de la puromycine (non illustré).

La sélection par puromycine a été suivie par une étape de sélection pour les cellules Halo-TPR à l'aide de la technique de cytométrie en flux FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Pour la sélection par cytométrie en flux, nous utilisons le système Halo comme marqueur de fluorescence, où les cellules sont préalablement incubées avec le ligand JF549 afin d'être triées lors de la sélection. À la suite de ce triage, nous avons obtenu une lignée cellulaire hétérozygote avec plus de 95% des cellules ayant la modification TPR-Halo (fig. 7d). Ainsi, la lignée cellulaire TPR-Halo que nous avons créée présente un marquage adéquat avec le HaloTag au niveau N-terminale et semble pouvoir être utilisée dans des buts d'imagerie. Ce type de marquage permet d'assurer que la protéine TPR reste fonctionnelle après fusion avec le HaloTag.

4.1.2. Les sous-populations de TPR dans le nucléoplasme

À la suite de la création de la lignée TPR-Halo, nous avons cherché à confirmer que la portion nucléoplasmique de TPR est bien présente dans le nucléoplasme et est distincte de la fraction liée au NPC. Nous avons d'abord marqué les cellules TPR-Halo avec le ligand JF549 dans une proportion sous-stœchiométrique. Cette méthode de marquage est utilisée en microscopie à molécules uniques pour limiter le nombre de protéines fluorescentes et d'être capable de suivre leur trajet de protéines individuelles. De plus, nous utilisons la méthode d'illumination HILO, précédemment mentionnée afin d'imager qu'une fraction du noyau des cellules pour réduire le bruit de fond.

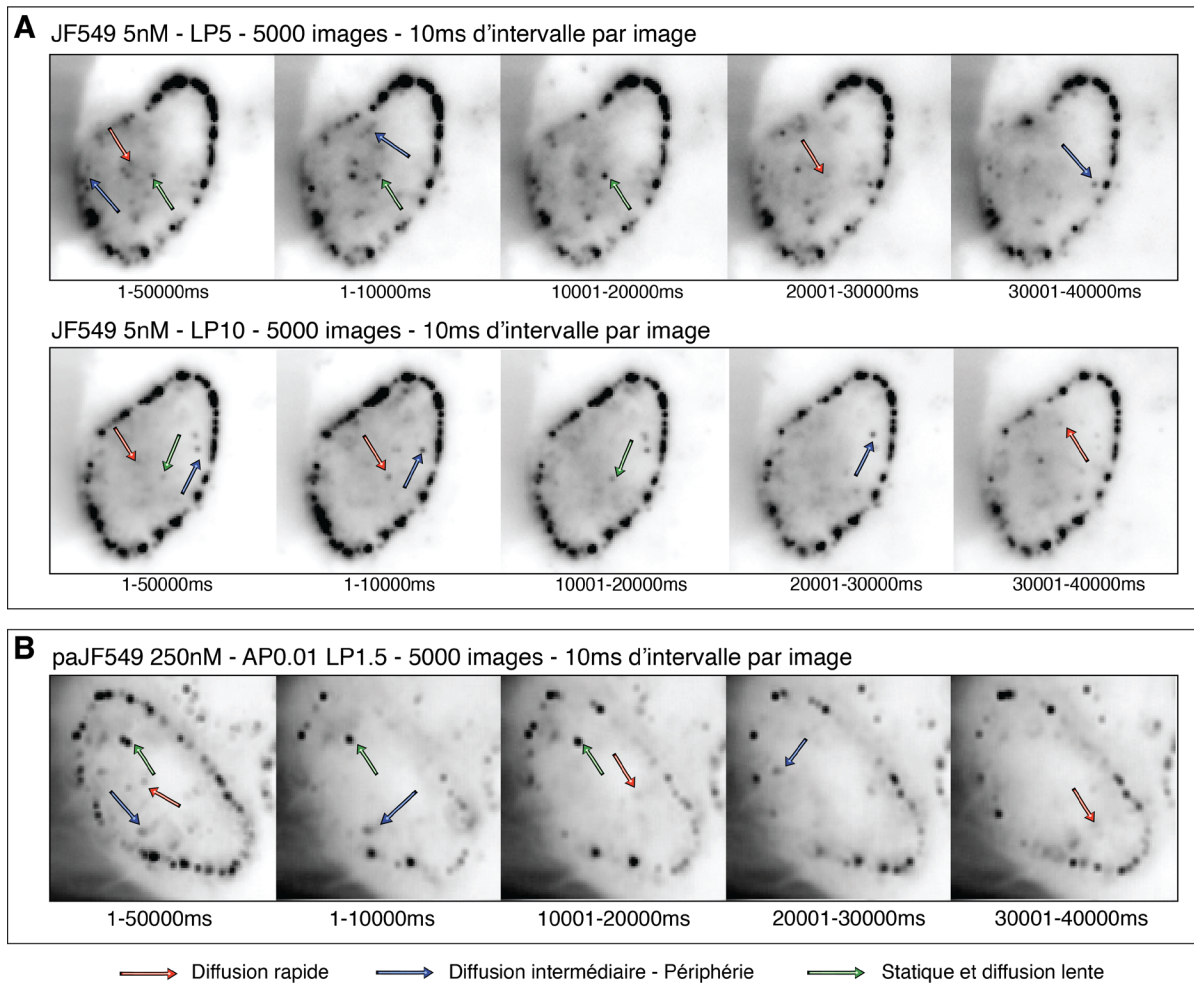


Figure 8. – Marquage de la lignée cellulaire HEK293F TPR-Halo avec deux méthodes. Un ensemble de 5000 images est pris à 10ms d'intervalle. Les sommes de l'intensité de la fluorescence de différents intervalles sont illustrées. L'acquisition est faite à l'aide du microscope Elyra en illumination HILO. (A) Les cellules sont marquées à l'aide de 5nM de JF549 pour un ratio sous-stœchiométrique. Deux intensités de laser, soit 5% et 10% ont été utilisées. (B) Le ligand photo activable paJF549 est utilisé à 250nM. Les protéines marquées avec paJF549 sont activées avec le laser 405nm à 0.01% et le laser 567nm à 1.5%.

Nous observons qu'il existe deux fractions de TPR dans le noyau à la suite d'une étude microscopique (fig. 8). En effet, nous avons d'abord la fraction au niveau de l'enveloppe nucléaire, en association avec le NPC; mais également une fraction dans le nucléoplasme en diffusion. Notre analyse préliminaire de la diffusion des molécules uniques de TPR suggère qu'elles pourraient être divisées en 3 catégories : la fraction statique, qui diffuse très peu et non liée au NPC; la fraction

mobile rapide, montrant des mouvements dynamiques et enfin, la fraction intermédiaire, restant aux alentours de la périphérie nucléaire. Ainsi, nos résultats indiquent l'existence de la fraction nucléoplasmique de TPR peut être divisées en sous population obéissant à différents patrons de mobilité allant de statique à très dynamique. Cependant, pour une meilleure description des ces comportements observés, une analyse non seulement qualitative mais quantitative est nécessaire.

Nous avons d'abord marqué les cellules avec un marquage sous stœchiométrique (fig.8a). Cette méthode implique de rajouter une quantité de ligands inférieure au nombre de protéines présentes pour avoir une faible proportion marquée avec la fluorescence. Nous avons donc utilisé 5nM du ligand JF549 pour notre analyse microscopique. Cependant, même si nous faisons un marquage sous-stœchiométrique, nous sommes limités pour l'analyse des mouvements des cellules. En effet, un grand nombre de molécules sont visibles et les mesures pour contrecarrer ces limitations ne sont pas encore optimisées. Nous avons précédemment tenté de réduire le nombre de molécules uniques en utilisant le laser à haute intensité. Ceci induit le photoblanchiment, qui correspond à la perte progressive de l'intensité du signal d'un fluorophore à cause de l'intensité du laser. Cependant, cette méthode n'est pas viable pour le long terme pour l'acquisition d'images en raison des risques de phototoxicité pour les cellules. De plus, le bruit de fond est très présent rendant l'analyse de ces trajectoires pratiquement impossible sans une très large marge d'erreur.

Ainsi, pour observer un nombre restreint de TPR-halo, nous avons donc décidé de marquer les cellules TPR-Halo à l'aide du ligand JF549 activable par le laser 405nm (paJF549)⁸¹. Ce ligand se distingue du JF549 par une modification permettant une activation de la fluorescence lorsqu'un laser puissant, comme 405nm, l'illumine. L'utilisation d'une puissance d'activation basse nous permet d'activer uniquement un faible nombre de molécules, facilitant le suivi de molécules uniques. Nous avons choisi ce système d'activation à cause des limitations que nous observons avec le ligand régulier mais également à cause de ses avantages. Effectivement, lorsqu'une grande proportion des protéines est activée en même temps, il est difficile de voir les différentes populations pouvant être présentes, particulièrement si ces dernières sont en faibles fractions. De plus, vu que la distribution de TPR est biaisée vers la périphérie (présent en 8 copies à chaque pore), le marquage sous-stœchiométrique crée une discrimination envers la portion nucléoplasmique présente en plus faible proportion. Ceci est donc surmonté avec l'activation

puisque les molécules fluorescentes seront représentées aléatoirement, donnant également l'opportunité aux petites fractions de populations d'être représentées.

Lorsque les cellules sont marquées avec paJF549, celles-ci sont observées par microscopie à molécules uniques en association avec l'illumination HILO mentionnée plus haut. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 8b, l'activation nous permet de suivre une proportion restreinte des molécules ainsi que leur comportement dans le noyau. Les images sont prises avec un temps d'exposition de 10ms par image, pour s'assurer de capturer les mouvements rapides de molécules libres. De plus, les images sont acquises pour un total de 5,000 images par série. Chaque image représente une somme de la fluorescence détectée pour 1,000 images, afin d'amplifier l'intensité du signal de fluorescence et également, observer une distribution des molécules uniques dans le noyau. La première de chaque figure représente la somme de toutes les images (fig.8b). Nous pouvons constater que la détection de molécule unique de TPR est facilitée par l'utilisation du ligand PA-JF459, en particulier pour les particules en diffusion rapide. De plus, le marquage de TPR liée au NPC est moins abondant suggérant qu'une faible portion de ces molécules a été activée. Ceci permet alors un suivi sur plusieurs images/ms pour déterminer la trajectoire des molécules de TPR nucléoplasmique. Ainsi, ce système nous a permis de disséquer, à l'échelle de molécules uniques, la distribution et la dynamique de TPR-Halo en microscopie en cellules vivantes.

4.2. La distribution de TPR dans le noyau

4.2.1. Méthode d'analyse des trajectoires

Pour analyser nos images de microscopie à molécules uniques, nous avons choisi d'établir des paramètres qui semblent pertinents pour notre étude. TPR est une protéine qui est principalement présente au niveau du NPC en plusieurs copies, mais nous nous intéressons à la fraction nucléoplasmique de cette dernière. Nous cherchons à caractériser cette population à travers sa distribution dans le nucléoplasme, la dynamique des sous-populations que nous avons caractérisées et également leurs possibles implications dans différents mécanismes cellulaires. Nous avons choisi la microscopie à molécules uniques car les trajectoires des molécules peuvent

être analysées pour extraire les paramètres qui les définissent. Un paramètre qui est également important à analyser est le coefficient de diffusion. Ce dernier permet d'identifier, avec un certain niveau de fidélité, si la molécule analysée est liée à la chromatine ou aux mRNPs. Selon les types de trajectoires que nous pouvons obtenir, nous avons suivi la méthode d'analyse de trajectoires mise en place par l'équipe Lerner et al. ⁷⁵

Pour leur analyse, ils se sont concentrés sur les protéines interagissant avec la chromatine, donc, nous avons adapté leur protocole pour une étude des sous populations nucléoplasmique de TPR. La méthode de classification de mouvements est basée sur la valeur α , qui représente le paramètre de l'anomalie, permettant de différencier le type de diffusion, comme *brownienne*, super-diffusion et sous-diffusion ⁸². Ainsi, selon la protéine d'intérêt utilisée et le type de mouvement, il est possible d'obtenir 5 types de trajectoires : soit celles dites *Dirigées*, en diffusion rapide avec $\alpha > 1$; celle *Browniennes* en diffusion libre avec $0.7 > \alpha > 1$; celle dite *Confinées* et *Restreintes*, en diffusion lente avec $\alpha < 0.7$; et enfin les *Butterfly*, correspondants à une trajectoire hybride *Confinée* et *Dirigée/Brownienne*. Ainsi, notre analyse est basée sur la classification des trajectoires des molécules uniques de TPR selon cette approche. ⁷⁵

4.2.2. Paramètre de diffusion de TPR

Pour déterminer les caractéristiques de chaque population de TPR dans le nucléoplasme, nous avons mené une analyse des trajectoires de chaque molécule à l'aide du logiciel TrackMate de Fiji. Cette extension permet de fournir les trajets de molécules et de les séparer selon leurs caractéristiques telles que leur longueur, forme et localisation. Pour notre analyse, la détection des particules a été faite en utilisant l'approche de la différence des Gaussiennes pour obtenir une estimation de l'intensité de sélection désirée. Cette méthode de détection est idéale pour les particules de petite taille et dépend principalement du diamètre des particules. La sélection se fait selon l'intensité de la fluorescence des particules pour limiter l'erreur de détection. Le résultat de cette première détection est ensuite soumis à une détection des trajectoires.

Ensuite, nous utilisons la méthode d'analyse « LAP Tracker » qui permet de faire une sélection des caractéristiques recherchée. Pour définir les trajectoires, TrackMate fait un lien entre les points en mouvement détecté dans les images consécutives, puis une sélection permet de relier

chaque point détecté, avec une possibilité de fermer les espaces entre plusieurs images. Pour notre analyse, la fermeture de l'escape entre des images est limitée à 2 pour éviter les erreurs de détection. Une fois le profil final des trajectoires obtenu, nous faisons une filtration des trajectoires pour un minimum de 5 points par trajectoire. Ceci permet d'éliminer les erreurs de détections et de maintenir uniquement les trajectoires ayant un profil adéquat pour une analyse plus poussée. Ensuite, lorsque nous avons obtenu les données filtrées des trajectoires de chaque cellule, celles-ci sont soumises à une analyse plus poussée à l'aide de MATLAB avec le Script du laboratoire de Lerner et al ^{75 76}.

Paramètres	Df - moyen	Df - rapide	Df - lente	Df - pic	Pourcentage
<i>Dirigée</i>	4.1 ± 4.65	3.32 - 13.5	0.55 - 2.71	(S)1.22 - (F)11	37
<i>Brownienne</i>	1.3 ± 1.65	2.71 - 4.05	0.25 - 1.49	0.67	33.9
<i>Restreinte</i>	0.79 ± 0.94	2.23 - 4.04	0.25 - 1.22	0.55	18
<i>Confinée</i>	0.18 ± 0.12	ND	0.09 - 0.37	0.17	9.1
<i>Butterfly</i>	ND	ND	ND	ND	2

Tableau 1. – Paramètres des différents types de trajectoires de TPR nucléoplasmique.

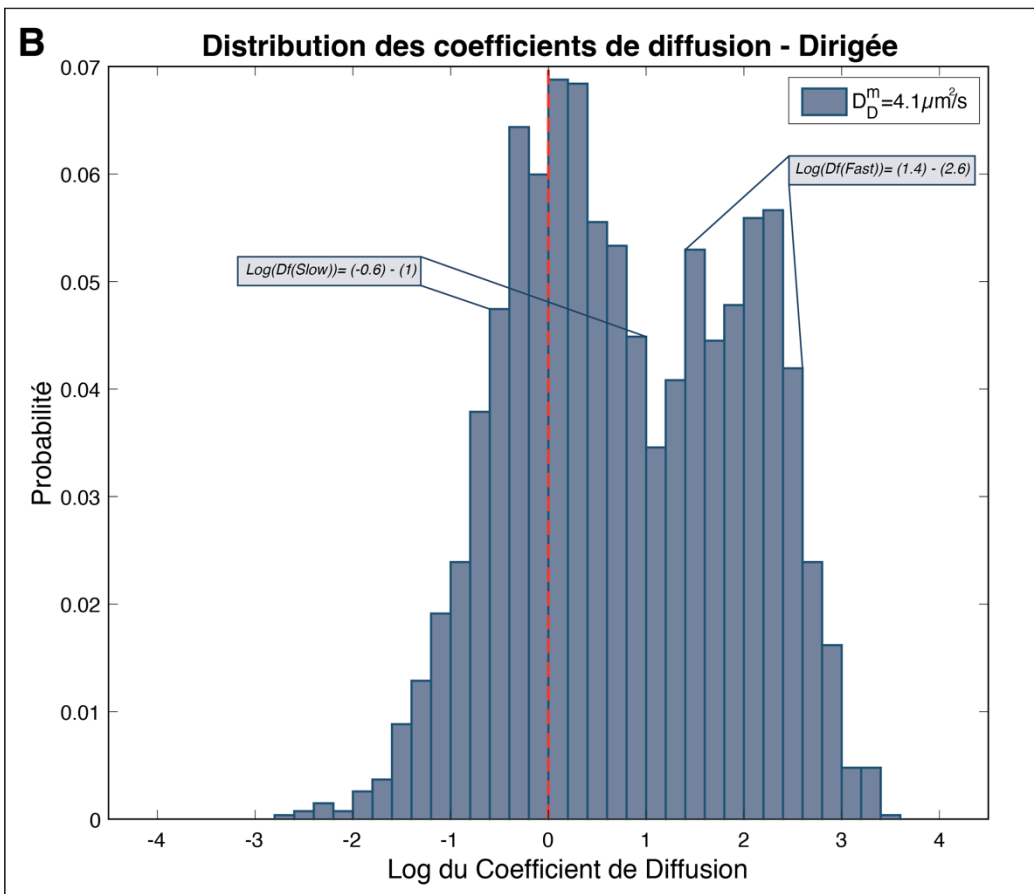
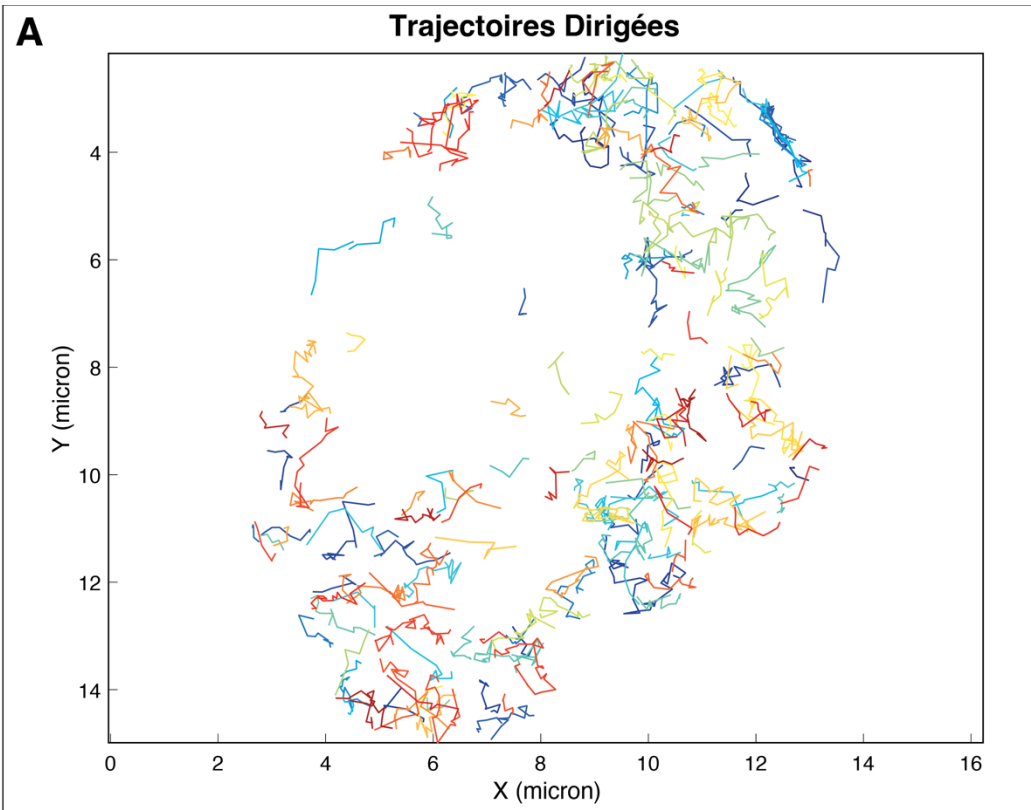


Figure 9. – Trajectoires *Dirigées*.

(A) Distribution des trajectoires *dirigées* à l'intérieur du noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT (acquises à 10ms/image). N=218 trajectoires sont mises en graphe selon leur distribution dans le noyau d'une cellule unique. Les trajectoires sont sélectionnées pour une taille de 5 points minimum et selon les caractéristiques *Dirigées*. (B) Histogramme du Log du coefficient de diffusion des trajectoires *Dirigées*. Le coefficient de diffusion moyen est de $Df(Dr) = 4.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Ainsi, l'analyse de nos données illustre les différents types de trajectoires qui peuvent être observés selon le protocole d'analyse suivi et leurs caractéristiques ainsi que le pourcentage de chaque type par rapport à l'ensemble des trajectoires analysées. Premièrement, nous avons les trajectoires *Dirigées* (fig.9a); il s'agit du type de trajectoire la plus observée dans nos données. Elles ne semblent pas être limitées dans un compartiment spécifique dans le nucléoplasme et ont un coefficient de diffusion moyen de $Df(Dr) = 4.1 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 4.65$ (fig.9b). Deux populations peuvent être identifiées à l'aide du profil du $\log(Df)$, une correspondant à une fraction rapide avec un intervalle de $Df(Dr\text{-Fast}) = 3.32 - 13.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Dr\text{-Fast})) = (1.4) - (2.6)$) représentant environ 40% et une fraction correspondant à une diffusion intermédiaire/lente, dont le $Df(Dr\text{-Slow}) = 0.55 - 2.71 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Dr\text{-Slow})) = (-0.6) - (1)$) à environ 60% (tab.1).

La disparité entre ces intervalles suggère alors que deux sous-populations seraient présentes dans les trajectoires *dirigées*. Les trajectoires *dirigées* représentent 37% des trajectoires analysées et sont généralement de taille variée avec une majeure partie d'entre elles représentant les trajectoires les plus courtes. Cependant, lorsque nous faisons une sélection avec les trajectoires avec un minimum de 10 points, nous observons une baisse du pourcentage des *Dirigées*. Ainsi, ces observations suggèrent que les trajectoires *dirigées* correspondraient à une sous-population de TPR nucléoplasmique en diffusion facilitée. La prochaine étape serait d'identifier la fraction rapide et intermédiaire de ces trajectoires pour une meilleure caractérisation.

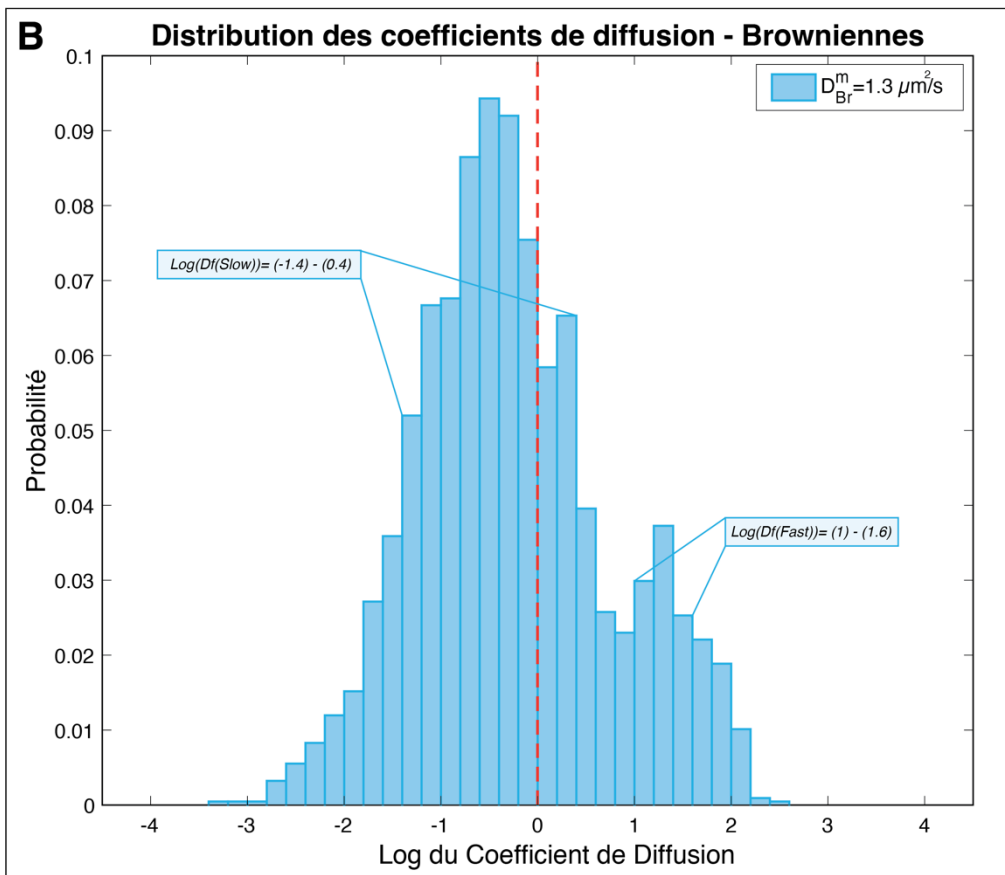
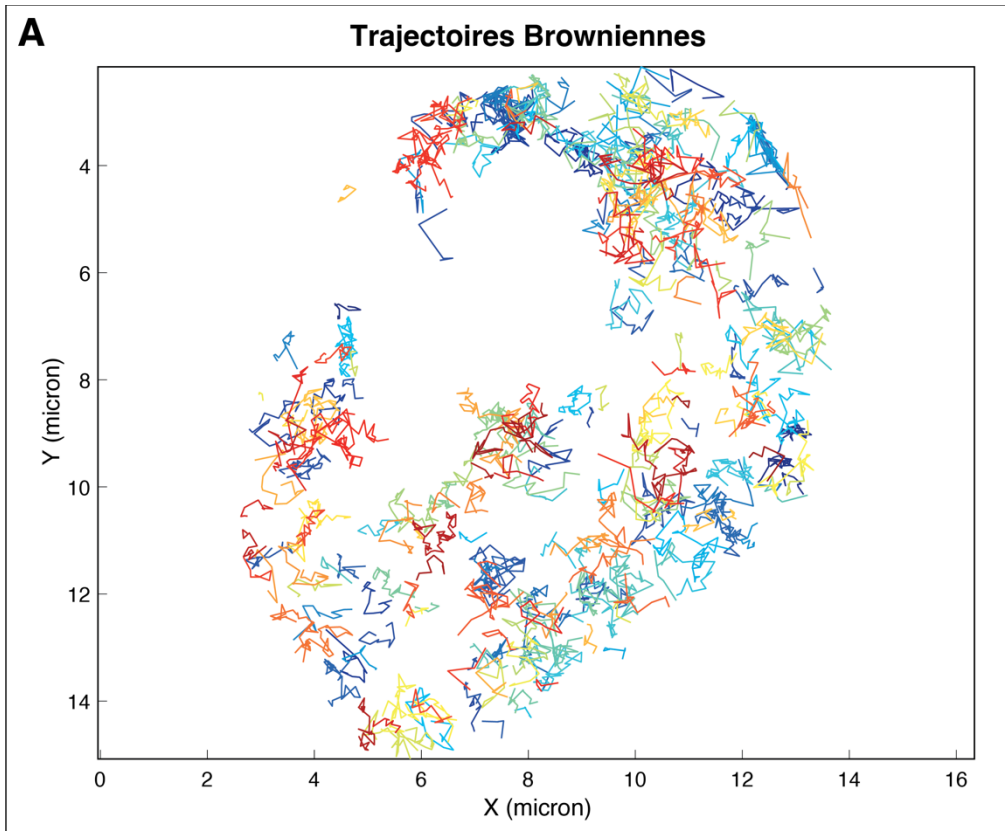


Figure 10. – Trajectoires *Browniennes*.

(A) Distribution des trajectoires *browniennes* à l'intérieur du noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT (acquises à 10ms/image). N=311 trajectoires sont mises en graphe selon leur distribution dans le noyau d'une cellule unique. Les trajectoires sont sélectionnées pour une taille de 5 points minimum et selon les caractéristiques *Browniennes*. (B) Histogramme du Log du coefficient de diffusion des trajectoires *browniennes* et leur coefficient de diffusion moyen est $Df(Br) = 1.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Ensuite, nous avons les trajectoires *Browniennes*, qui représentent 33.9% des trajectoires après notre analyse (fig.10a). Il s'agit des particules dont la diffusion est dite libre dans le nucléoplasme. Comme mentionné précédemment, la méthode d'analyse que nous avons utilisée considère qu'une trajectoire est en diffusion libre si la valeur de son paramètre d'anomalie entre 0.7 et 1. L'analyse de la distribution des coefficients de diffusion permet d'identifier deux fractions, une avec une diffusion rapide $Df(Br\text{-Fast}) = 2.71 - 4.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Br\text{-Fast})) = (1) - (1.6)$) avec large déplacement qui représente environ 30% de ces trajectoires; et une autre avec une diffusion lente/intermédiaire $Df(Br\text{-Slow}) = 0.25 - 1.49 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Br\text{-Slow})) = (-1.4) - (0.4)$) et un déplacement restreint représentant environ 70% des *Browniennes* (tab.1). Les trajectoires *browniennes* ont un coefficient de diffusion moyen de $Df(Br)=1.3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 1.65$ qui reste similaire lorsque la taille des trajectoires et les temps d'exposition sont changés (fig.10b). Ainsi, en prenant en compte nos résultats ainsi que la nature de TPR, étant une protéine d'environ 270kDa, nous suggérons alors que cette population représente la proportion des molécules de TPR en diffusion libre dans le nucléoplasme.

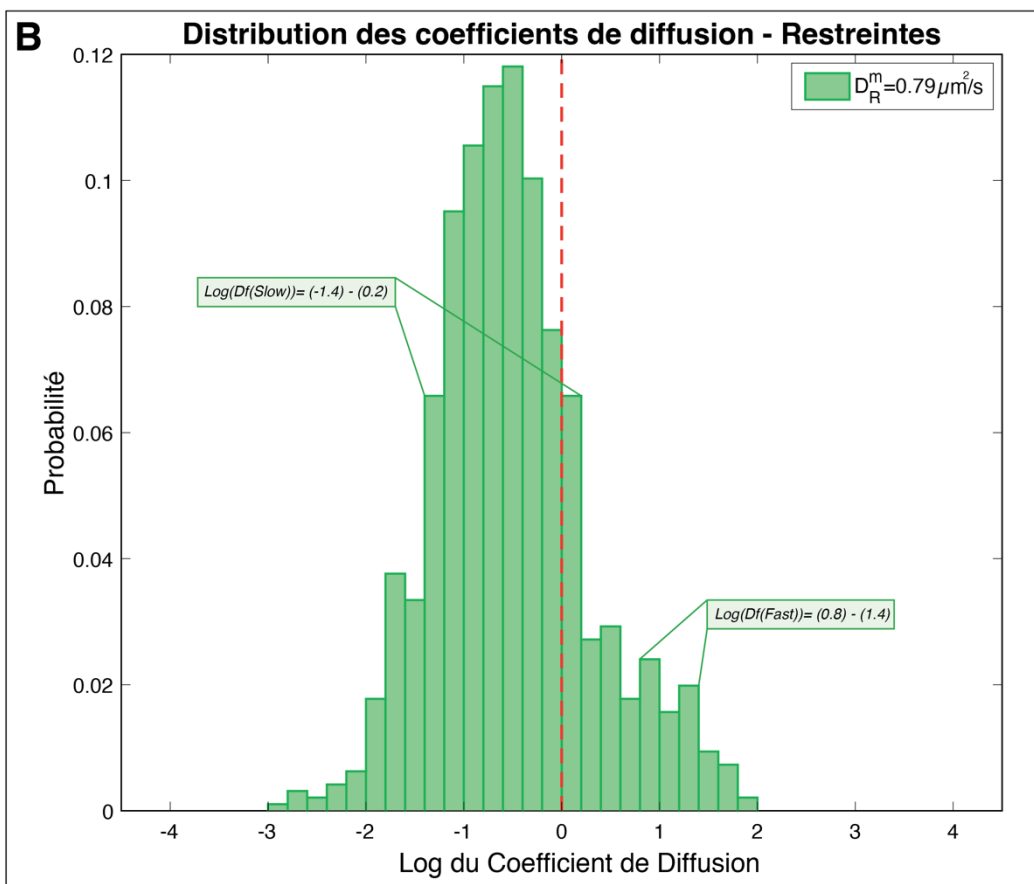
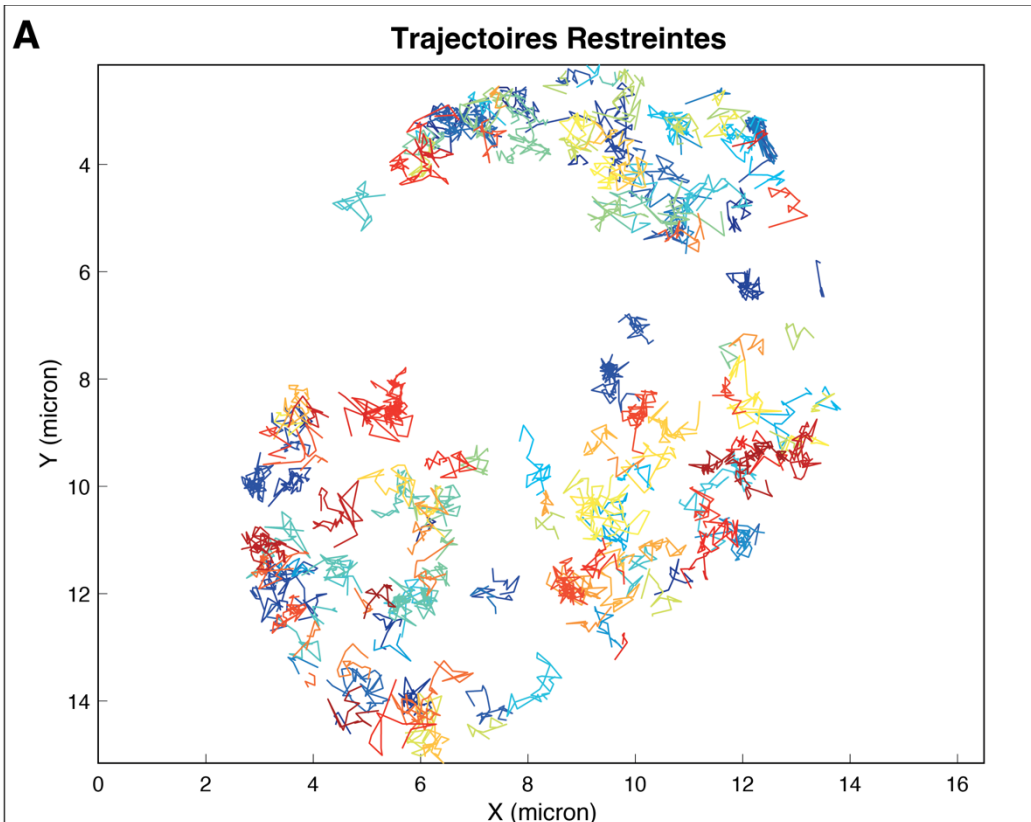


Figure 11. – Trajectoires *Restreintes*.

(A) Distribution des trajectoires *restreintes* à l'intérieur du noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT (acquises à 10ms/image). N=199 trajectoires sont mises en graphe selon leur distribution dans le noyau d'une cellule unique. Les trajectoires sélectionnées filtrées pour une taille de 5 points minimum et selon les caractéristiques *restreintes*. (B) Histogramme du Log du coefficient de diffusion des trajectoires *restreintes* et leur coefficient de diffusion moyen est $Df(Rt) = 0.79 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Nous observons également des trajectoires *restreintes* (fig.11a). Celles-ci sont divisées selon la longueur de leur déplacement ou saut comparé à un contrôle lié à chromatine ⁷⁵. Les fractions sont séparées selon leur saut, avec $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ comme référence. Pour notre analyse, nous avons considéré que les trajectoires dont le saut est supérieur à $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ correspondent à la fraction *restreinte*. Elles représentent un pourcentage relativement plus bas que les trajectoires '*Dirigées*' et '*Browniennes*', soit 18%, et possèdent un déplacement plus large. L'analyse de ces trajectoires montre que les particules observées ont un mouvement confiné mais, elles diffusent cependant dans un périmètre plus large que les particules liées à la chromatine comme celles utilisées dans le contrôle.

Le coefficient de diffusion moyen pour les trajectoires *restreintes* est de $Df(Rt) = 0.79 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.94$ avec environ 85% de ces dernières ayant une diffusion lente principalement entre $Df(Rt\text{-Slow}) = 0.25 - 1.22 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Rt\text{-Slow})) = (-1.4) - (0.2)$) et une rapide d'environ 15% dont le $Df(Rt\text{-Fast}) = 2.23 - 4.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Rt\text{-Fast})) = (0.8) - (1.4)$) (fig.11b)(tab.1). Ces trajectoires sont similaires aux trajectoires *dirigées* dans leur distribution et leur fraction en diffusion lente ou intermédiaire avec comme principales différences leur confinement dans le nucléoplasme ainsi que la longueur de leurs trajectoires. Les trajectoires *restreintes* sont plus longues que les trajectoires *dirigées* de plus, une plus large proportion des trajectoires *restreintes* ont une diffusion lente. En prenant en compte ces résultats, nous supposons que les trajectoires *restreintes* pourraient correspondre à une sous-population de TPR nucléoplasmique en association avec des complexes de protéines, ou dans un sous-compartiment nucléaire, tels qu'un NS ou une autre forme de granule contenant TPR. Il reste encore à identifier les protéines de ce potentiel interactome.

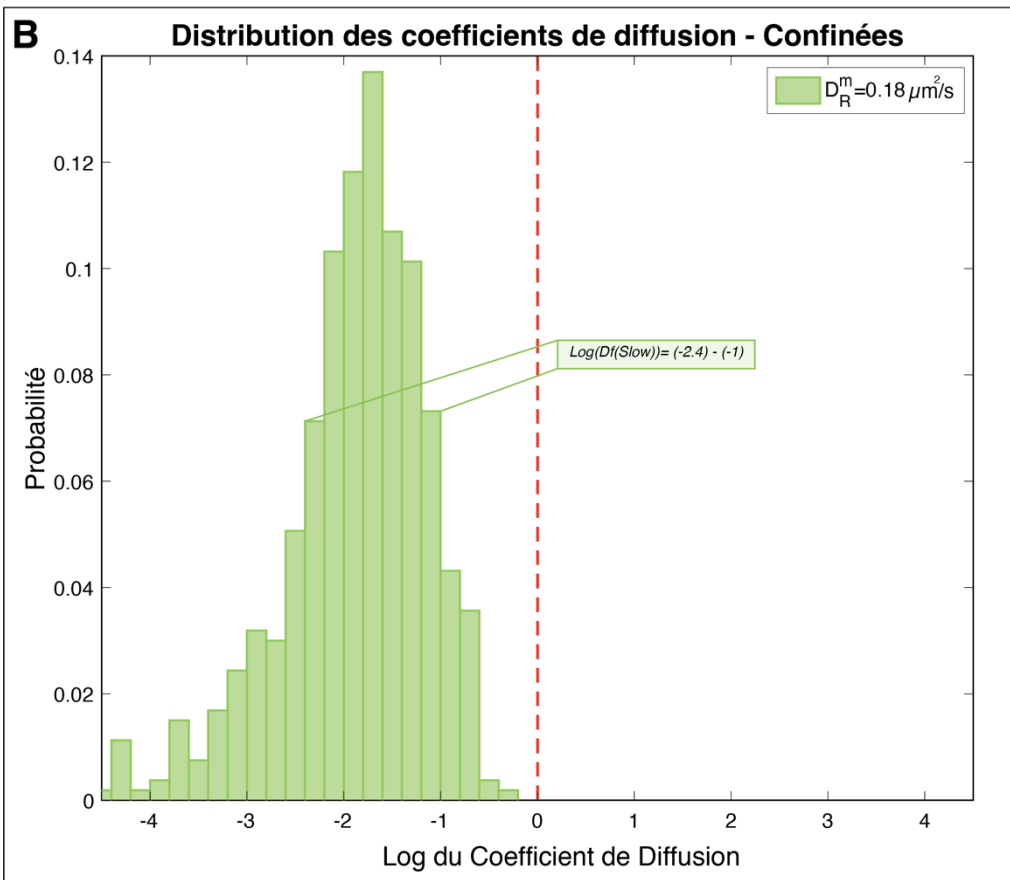
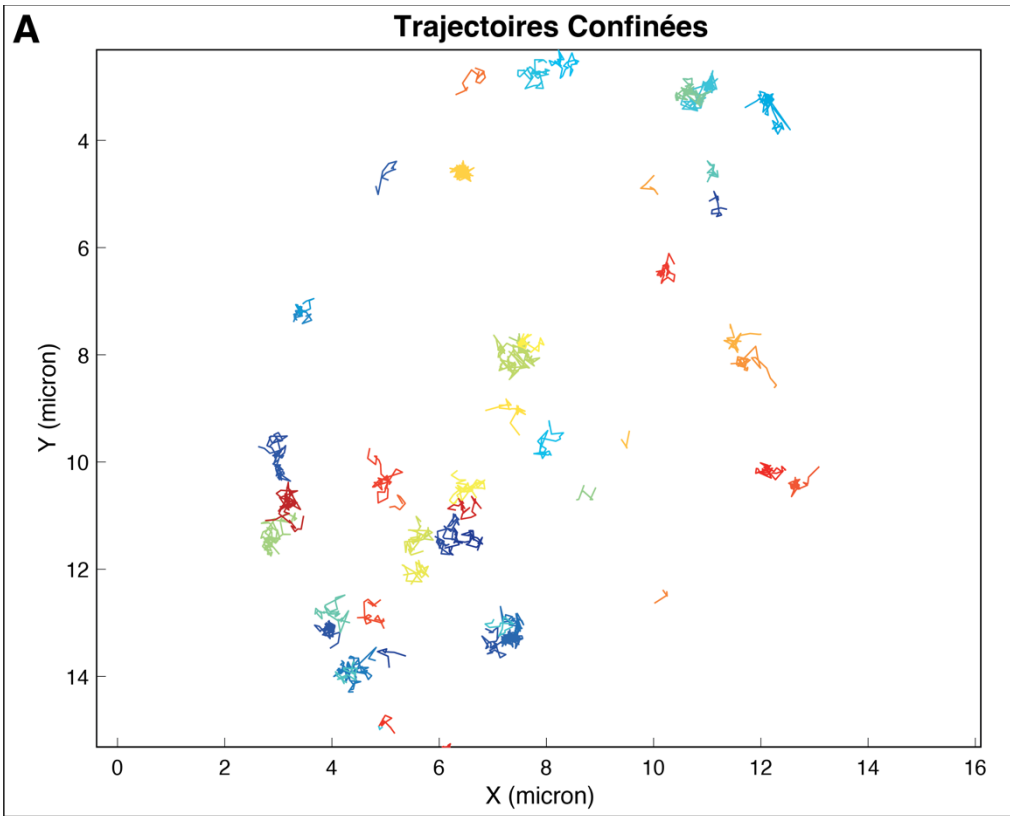


Figure 12. – Trajectoires *Confinées*.

(A) Distribution des trajectoires *confinées* à l'intérieur du noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT (acquises à 10ms/image). N=53 trajectoires sont mises en graphe selon leur distribution dans le noyau d'une cellule unique. Les trajectoires sont filtrées pour une taille de 5 points minimum et selon les caractéristiques *Confinées*. (B) Histogramme du Log du coefficient de diffusion des trajectoires *confinées* et leur coefficient de diffusion moyen est $Df(Cf) = 0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Pour les trajectoires ayant un saut inférieur ou égal 0.15 micron, nous considérons qu'il s'agit de celles dites *Confiné* (fig.12a). Elles ne représentent qu'un faible pourcentage de l'ensemble des trajectoires, soit 9.1%, comparativement au type précédemment présenté. Il s'agirait de la proportion lié à la et leur déplacement est confiné et en dessous de 100nm de radius⁷⁵. Leur coefficient de diffusion moyen est $Df(Cf) = 0.18 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.12$ avec un intervalle principalement compris $Df(Cf\text{-Slow}) = 0.09 - 0.37 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\log(Df(Cf\text{-Slow})) = (-2.4) - (-1)$), ce qui correspondrait aux valeurs attendues pour une protéine liée à la chromatine dans le contrôle (fig.12b)(tab.1). Bien qu'elles soient en diffusion lente, leur longueur est d'environ 5-15 points par trajectoire, ce qui est relativement court pour une particule statique. Par conséquent, nous supposons que cette fraction représente la sous-population statique et/ou confinée de TPR dans le nucléoplasme.

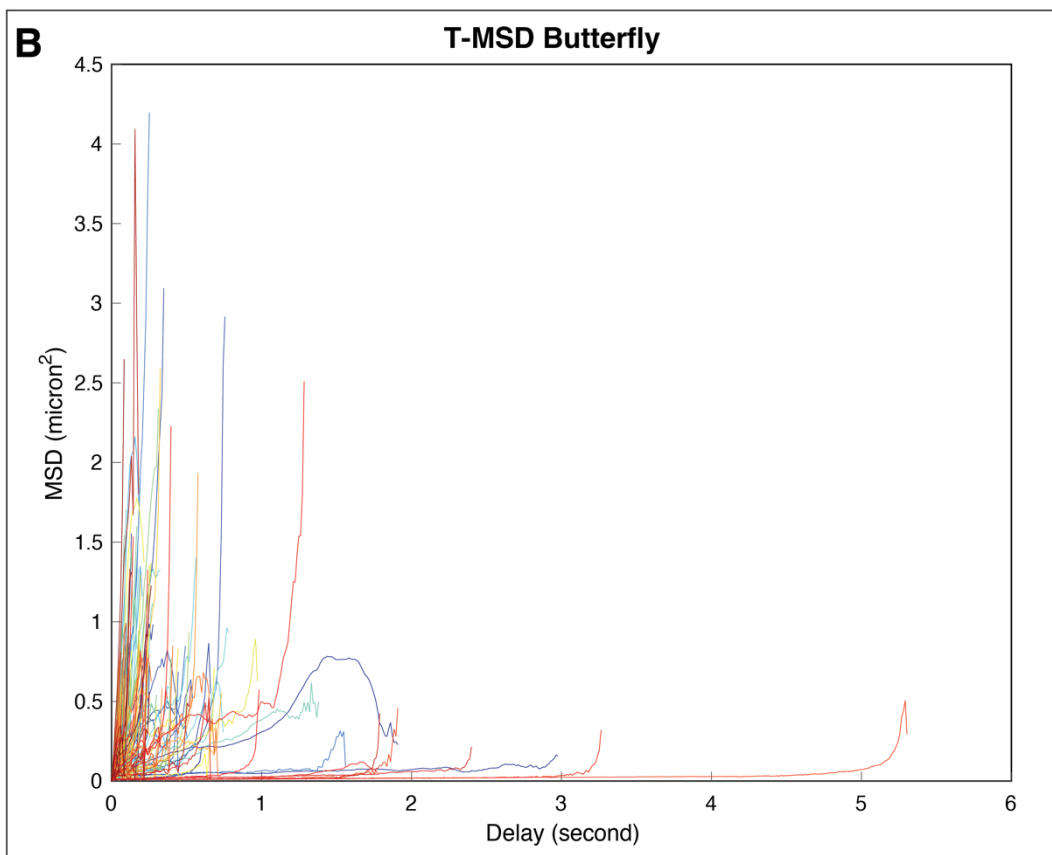
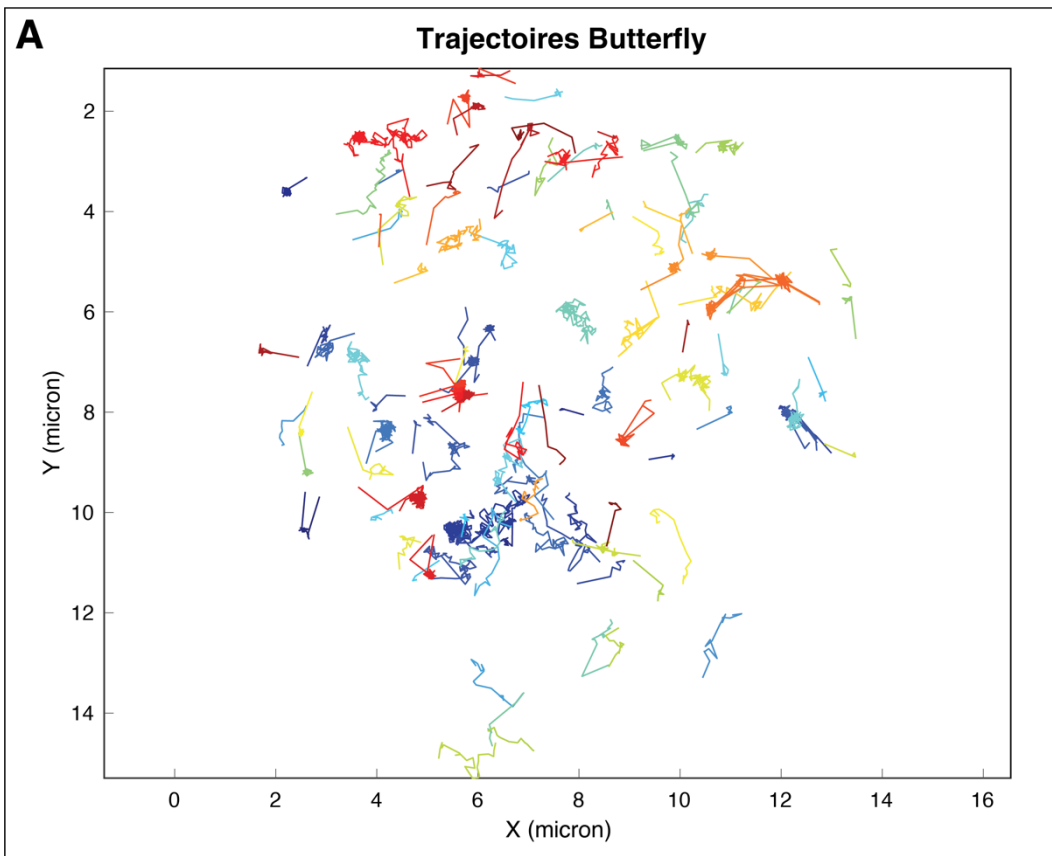


Figure 13. – Trajectoires *Butterfly*.

(A) Distribution des trajectoires *Butterfly* sur l'ensemble des cellules analysées de la lignée TPR-Halo HEK293FT à l'intérieur du noyau. Les trajectoires sont sélectionnées pour une taille de 5 points minimum et selon les caractéristiques *Butterfly*. (B) Diagramme du carré de la moyenne du déplacement (MDS) en fonction du temps.

Parmi les types de trajectoires observées dans notre analyse, nous avons également identifié une catégorie appelée *Butterfly* qui représente 2% des trajectoires totales (fig.13a). Celle-ci est constituée de particules pour lesquelles le mouvement est alternativement confiné et dirigé sur l'ensemble du parcours de la molécule (fig.13b). D'après les critères définis dans Lerner et al., la portion dite *dirigée/brownienne* du mouvement de la molécule doit représenter 30% de la longueur totale de la trajectoire. Selon notre analyse les particules présentant un mouvement *Butterfly* semblent préférentiellement localisées autour de la périphérie nucléaire et sont généralement courtes puisqu'elles sont généralement définies par moins de 10 points.

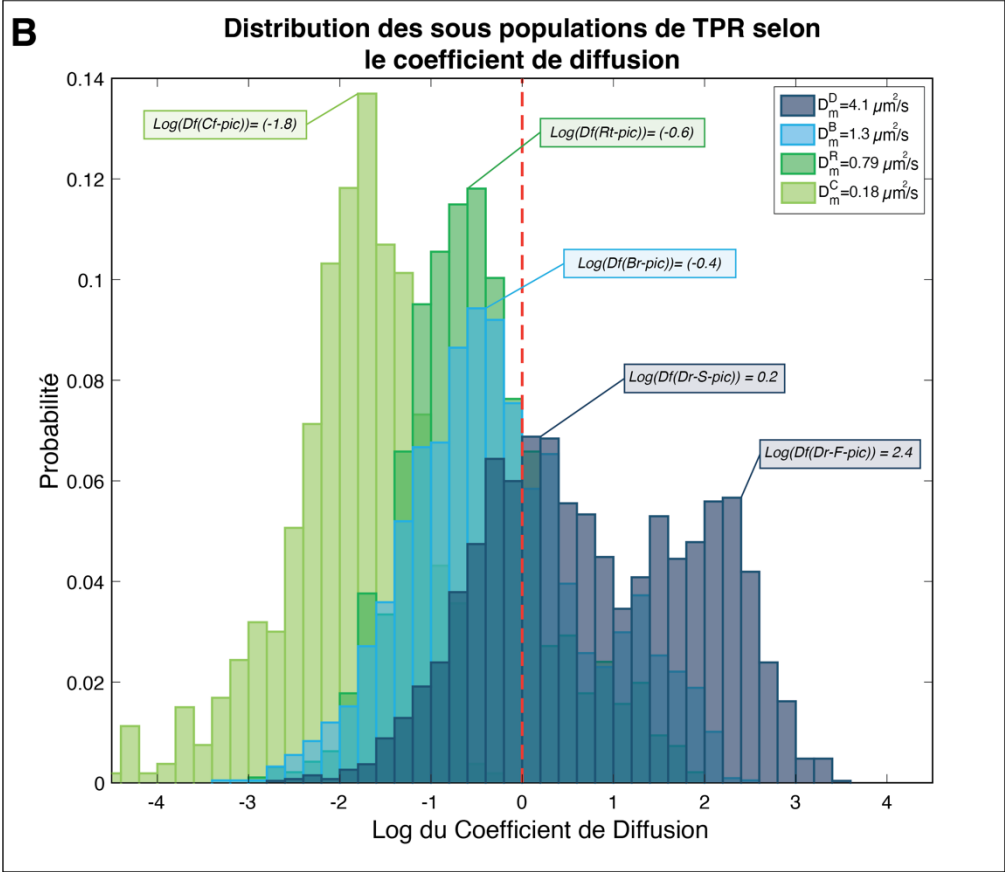
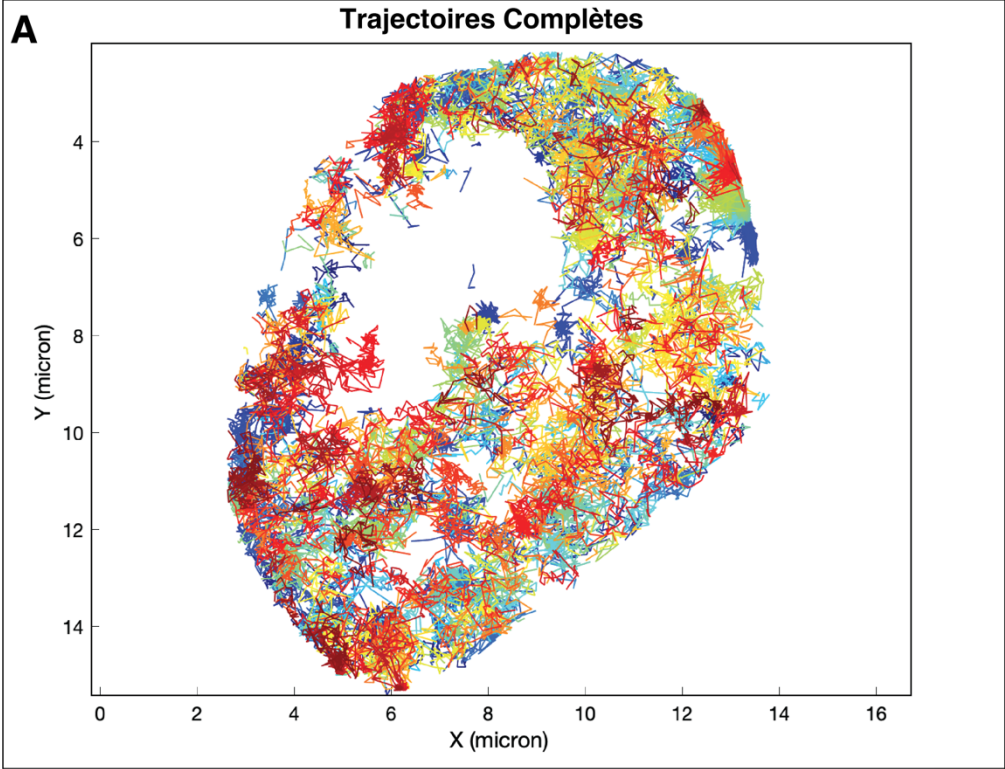


Figure 14. – Distribution des sous-populations de TPR.

(A) Distribution de toutes les trajectoires dans le noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT (acquises à 10ms/image). N=2096 trajectoires sont mises en graphe selon leur distribution dans le noyau d'une cellule unique. Les trajectoires sont sélectionnées pour une taille de 5 points minimum et représentées selon leur distribution à l'intérieur du noyau. (B) Histogramme du Log du coefficient de diffusion des différents types de trajectoires selon leur coefficient de diffusion. Les trajectoires *Dirigées* sont représentées en Bleu Foncé, les *Browniennes* en Bleu Clair, les *Restreintes* en Vert Foncé et les *Confinées* en Vert Clair, pour des coefficients de diffusion respectifs de 4.1, 1.3, 0.79 et 0.18 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Il est intéressant de noter que lorsque toutes les trajectoires sont représentées (fig.14a), nous remarquons qu'il existe des zones d'exclusions où les molécules de TPR diffusant dans le noyau sont absentes. Comme l'illustre la représentation des trajectoires d'un noyau unique (fig.14a), ces régions du noyau sont dépourvues de trajectoires et il semble que les trajectoires confinées résident autour de ces zones sans y pénétrer. Ceci est observé dans chacune des cellules analysées individuellement (non illustrée). Les cellules étant placées sur un pétri de microscopie à fond en verre, ces dernières sont imagées lorsqu'elles sont plates sur la lamelle. De plus, cet effet du nucléole est observable lorsque nous limitons le nombre de points par trajectoires à un minimum de 5. Dans le cadre de notre étude, nous supposons que les trajectoires ayant moins de 5 points par trajectoires représentent le bruit de fond et les molécules du ligand libre. Ainsi, en raison de leur disposition et du fait que les trajectoires *confinées* correspondent à la fraction de protéines liées à la chromatine, il nous est possible de suggérer que ces zones d'exclusions de trajectoires dans le nucléoplasme représentent les nucléoles des cellules.

Pour discerner les différentes populations de TPR diffusant dans le noyau selon leur coefficient de diffusion, nous avons représenté les distributions de chaque type de trajectoire pour les comparer. Dans la figure 14b, nous observons que la moyenne du coefficient de diffusion des différents types de trajectoires. Les trajectoires *dirigées* représentent la principale action ayant une diffusion facilitée ou rapide, avec une proportion des trajectoires *browniennes* et *restreintes*. De plus, nous pouvons noter un chevauchement des valeurs correspondant un coefficient de diffusion de 0.45 à 1.5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ entre les trajectoires *browniennes*, *restreintes* et *dirigées*. Le coefficient de diffusion moyen de toutes les trajectoires est $D_f(\text{Tot}) = 1.94 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 3.1$, suggérant qu'une grande

majorité des trajectoires ont une diffusion rapide qui serait potentiellement celles d'une protéine en diffusion.

Les deux populations peuvent être identifiées parmi les trajectoires en termes d'abondance selon de coefficient de diffusion. D'abord, nous avons le pic pour $\log(Df) < 0$, qui représente les trajectoires *restreintes* en diffusion lente, avec $Df(Cf) = 0.55 \mu\text{m}^2/\text{s}$ qui est compris dans les valeurs suggérées de la diffusion des mRNP qui est entre $0.3-0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Pour le deuxième pic, la moyenne du coefficient est autour de $12.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, montrant qu'une bonne partie des molécules de TPR est en diffusion rapide ou facilité, ce qui dans notre cas, serait les *dirigées*. Il est intéressant de noter que les *browniennes* possèdent deux pics à environ $0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, ce qui dans notre cas, correspondrait à fraction de TPR nucléoplasmique en diffusion libre. En prenant en compte ces résultats, nous pouvons suggérer que notre méthode de microscopie à molécules uniques nous permet de caractériser les populations de TPR dans le noyau. Notre méthode d'analyse semble capable de différencier entre différents types de trajectoires selon leurs caractéristiques. De plus, les différentes populations de TPR nucléoplasmique ne se comportent pas de la même manière ce qui suggère possiblement différentes fonctions dans le noyau ⁷⁵.

4.2.3. Différents modes de diffusion de TPR de la périphérie au nucléoplasme

Pour caractériser la population de TPR dans le nucléoplasme, nous avons réalisé une analyse des trajectoires des molécules de TPR diffusant dans le noyau en excluant la périphérie nucléaire. Cependant, la population de TPR en association avec le NPC au niveau de l'enveloppe nucléaire est beaucoup plus grande que celles nucléoplasme, ce qui créerait un biais vers ces dernières. TPR est présent en plusieurs copies au niveau du NPC et celles-ci correspondraient aux molécules statiques ou en diffusion lente du noyau. En prenant en compte ces deux facteurs, nous avons imagé des cellules et avons fait une analyse avec une partie incluant l'enveloppe nucléaire, dont TPR-NPC et une en l'excluant. Comme mentionné précédemment, la forte présence de TPR au niveau du pore nous a poussé à mener cette analyse avec les trajectoires dont la taille est de 7 cadres au minimum. Cette longueur de trajectoires utilisée pour l'analyse est choisie pour maintenir la consistance d'analyse et éviter surestimation des trajectoires lorsque les TPR-NPC sont présents pour l'analyse.

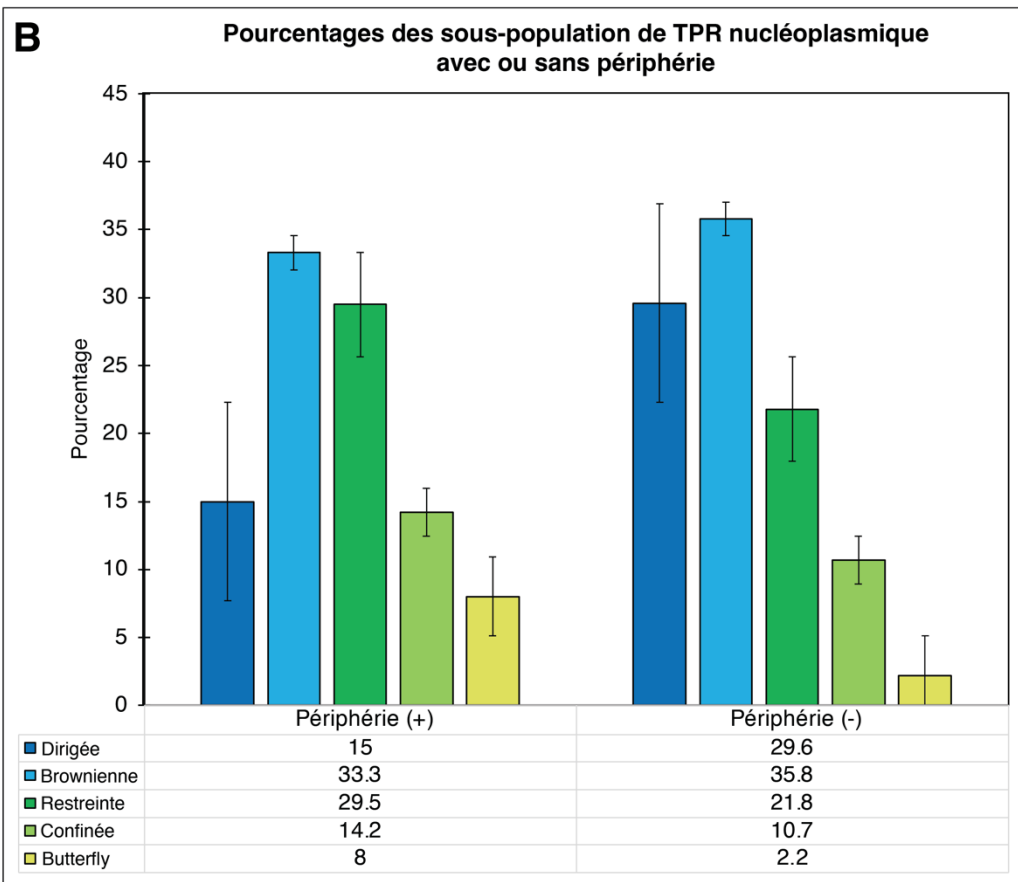
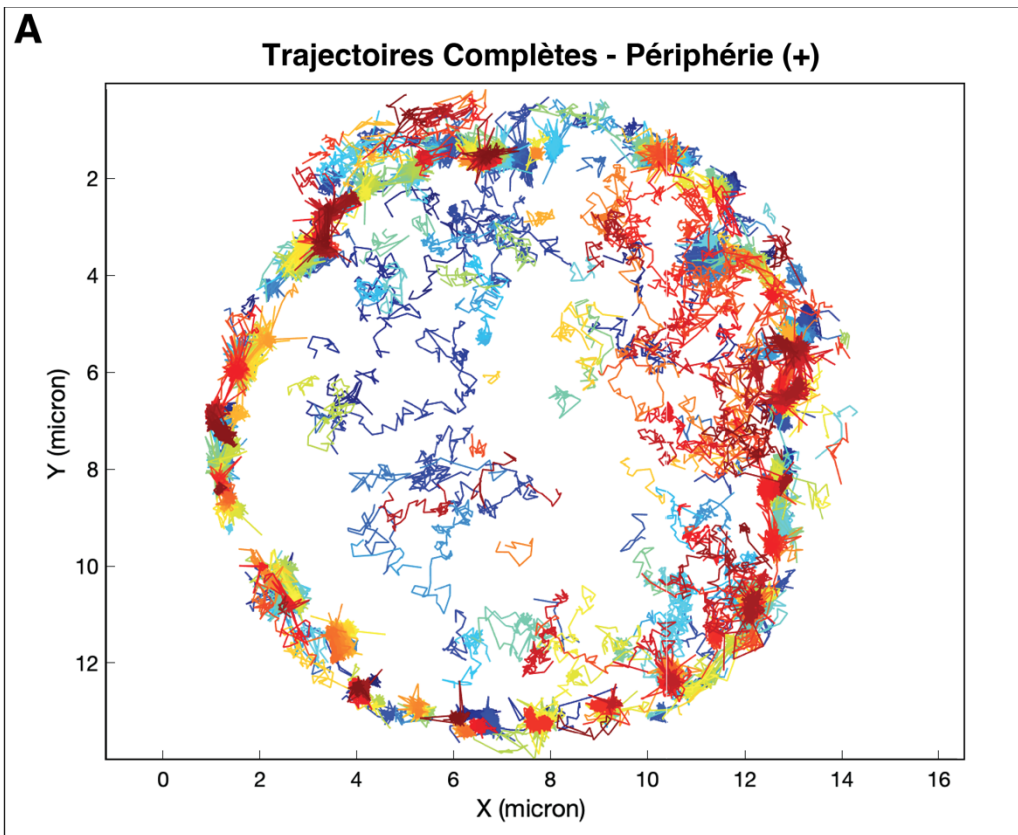


Figure 15. – Comparaison des types de trajectoires incluant la périphérie nucléaire.

(A) Distribution de toutes les trajectoires dans le noyau d'une cellule de la lignée TPR-Halo HEK293FT. Les trajectoires sont sélectionnées pour une taille de 5 points minimum et représentées selon leur distribution dans le noyau. (B) Comparaison du pourcentage des sous-populations de TPR en présence et en absence de la périphérie nucléaire.

Comme l'illustre la figure 15a, l'inclusion de la périphérie nucléaire induit une augmentation du nombre de trajectoires *confinées* lorsque comparée avec le contrôle (fig.15a). Les méthodes d'analyse incluant et excluant la périphérie du noyau mettent en évidence les mêmes sous-populations parmi la fraction mobile de TPR-Halo (fig.15b) avec cependant des tailles de populations différentes. Ainsi, les trajectoires *Dirigées* sont celles les plus affectées allant de 15% lors que TPR-NPC est présent à 29% après l'exclusion. Ceci affecte également les trajectoires *Confinées* et *Restreintes* qui subissent une baisse d'environ 3.5% et 7% respectivement, ce qui est attendu puisque l'inclusion de la périphérie dans l'analyse enrichi l'ensemble des trajectoires avec des trajectoires *confinées* et relativement statiques.

Cependant, il est intéressant de noter que la fraction des trajectoires *Butterfly* est affectée négativement lorsque l'analyse inclut uniquement les trajectoires nucléoplasmiques. Cette dernière passe de 8% à 2.2%, ce qui montre que ce type de trajectoires est principalement observé au niveau de la périphérie nucléaire aux alentours du NPC. En outre, les trajectoires *Butterfly* sont celles dont la détection est sujette à un plus fort taux d'erreur en raison des deux types de mouvement qu'elles possèdent. Ainsi, nous supposons que la présence de plusieurs molécules de TPR au niveau de la périphérie avec une courte distance entre elles, pourrait être responsable de la surreprésentation des trajectoires *Butterfly* lorsque la périphérie est incluse. Ceci pourrait aussi expliquer la baisse des *trajectoires dirigées*. En définitive, nous concluons que la présence des molécules de TPR liée au NPC en périphérie augmente le risque d'erreur dans notre analyse et n'apporte pas d'information sur la population nucléoplasmique de TPR. Par conséquent, le reste de notre étude sur la caractérisation de TPR nucléoplasmique se concentrera principalement sur les données excluant la périphérie nucléaire.

4.3. L'inhibition de la transcription affecte la distribution de TPR dans le noyau

4.3.1. TPR forme des granules nucléaires après traitement avec DRB

La protéine TPR est présente dans le noyau associé au NPC mais également dans le nucléoplasme. Comme détaillé dans les sections 2a et 2b, la fraction de TPR mobile dans le noyau a pu être séparée en sous-populations distinctes en fonction des paramètres de diffusion et des trajectoires mesurées lors d'approches de suivi de molécules unique. Ces observations surprenantes contestent le rôle de TPR dans le noyau. En effet, pourquoi une protéine connue pour l'assemblage du panier aux pores nucléaire posséderait différentes modalités de diffusion à l'intérieur du noyau? Nous proposons que les différents types de mouvements observés pour TPR dans le noyau reflètent une certaine hétérogénéité fonctionnelle de cette protéine lorsque celle-ci diffuse librement dans le noyau.

Nos résultats préliminaires d'étude de l'interactome de TPR isolé par purification par affinité et analyse en spectrométrie de masse indiquent que l'interactome de TPR s'étend au-delà de la périphérie nucléaire et du pore (fig.6b). En effet, TPR interagit avec des facteurs impliqués dans le métabolisme des ARN messagers tel que les facteurs de la maturation de la queue 3'-terminal ou avec des protéines assemblant le spliceosome et ses cofacteurs.

Il est généralement accepté que les étapes de maturation et d'épissage des ARNm se déroulent de façon co-transcriptionnelle ⁸³. Ainsi nous avons postulé que TPR est impliqué dans la maturation et l'export des mRNP en amont de l'arrimage des mRNP au pore nucléaire et rencontre les messagers avant à l'intérieur du noyau. Ces potentielles fonctions dans le noyau en lien avec le métabolisme de l'ARNm seraient à l'origine des différents profils de diffusion de TPR. Afin de tester cette hypothèse nous avons observé comment l'inhibition de la production des mRNPs affecterait la localisation et la mobilité de la fraction nucléoplasmique de TPR. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de la transcription par l'ARN polymérase II, DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside), inhibant spécifiquement la kinase Cdk9 nécessaire à l'élongation ⁸⁴. Cet inhibiteur possède l'avantage d'avoir un temps d'action relativement court

permettant de suivre les effets d'une absence de transcription sur la population de TPR dans le noyau.

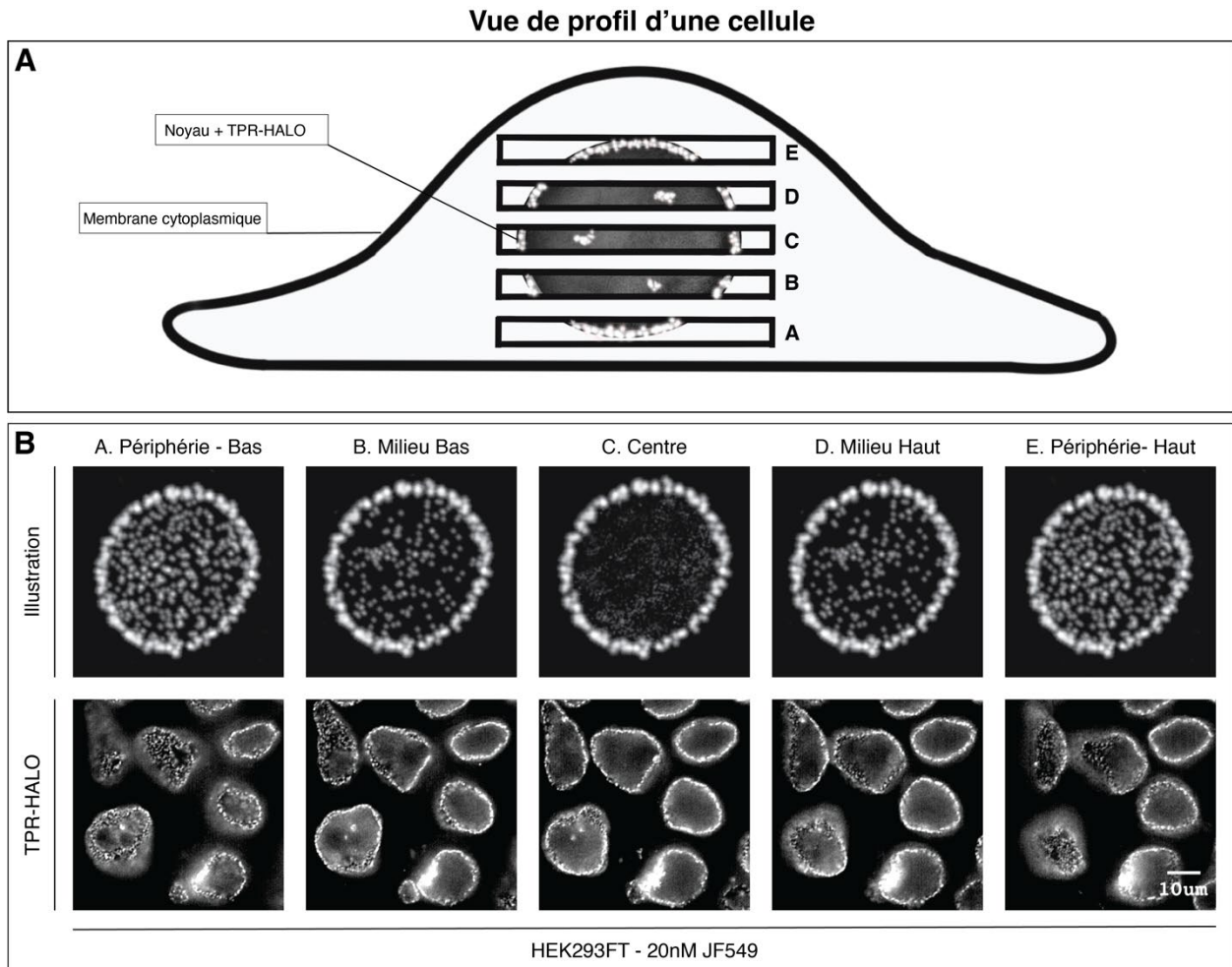


Figure 16. – Représentation schématique de la prise d'images sur l'axe Z.

(A) Illustration schématique d'une vue de profil d'une cellule. (B) Différentes coupes de la cellule dans l'axe Z du noyau Les images sont prises avec 0.24 microns d'intervalle. Chaque image représente une couche de la cellule sur un plan Z. Avant l'acquisition des images, les cellules HEK293FT TPR-HALO sont fixées et marquées à l'aide du ligand JF549 à 20nM. Les images sont prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Pour s'assurer de l'effet de l'inhibition de la transcription sur TPR lorsqu'il est ajouté aux cellules, nous avons réalisé une étude en épifluorescence sur des cellules marquées avec 20nM du ligand JF549 et 1ug/mL du marqueur d'ADN Hoechst. Les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur DRB pour une concentration de 100uM et ont ensuite été fixées à différents temps pour comparer l'effet de DRB avec le contrôle. En raison de la distribution de TPR sur la surface de l'enveloppe nucléaire, les images ont été prises en pile sur le Z afin de représenter l'intérieur du noyau sans le bruit de fond pouvant provenir de la couche supérieure et inférieure du noyau (fig16a). Pour maintenir l'uniformité des résultats, nous avons représenté une projection du z de 12 images avec un intervalle de 0.24 micron entre chaque image. Les images illustrées sont une représentation d'une pile d'images représentant une tranche de 3.6 microns de l'intérieur du noyau (fig16b).

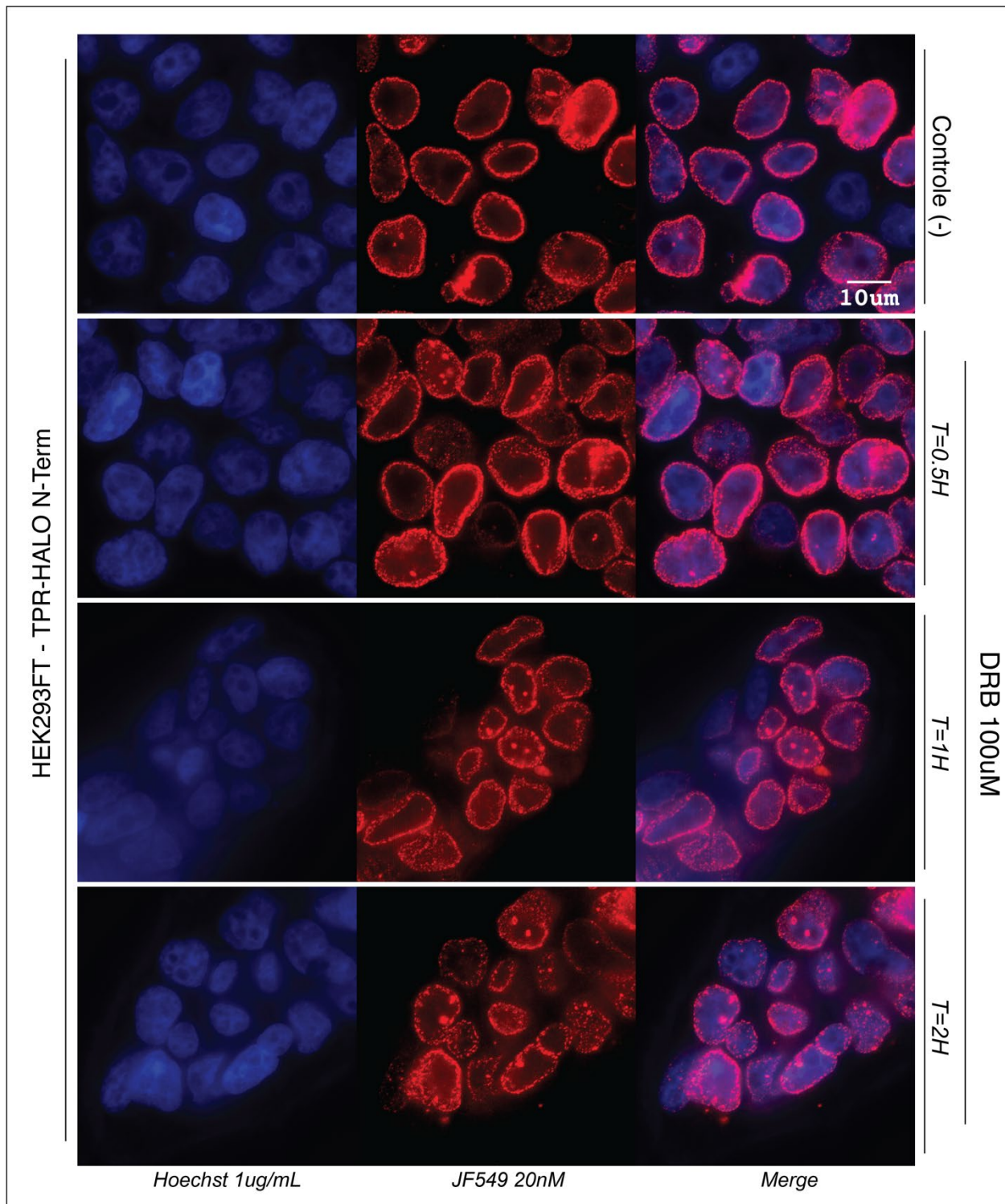


Figure 17. – L'inhibition de la transcription Pol-II affecte la distribution de TPR dans le noyau.
 (A) La présence de DRB induit la formation de granules dans le noyau. Les cellules TPR-HALO HEK293FT sont marquées avec le ligand JF549 à 20nM. Les cellules contrôle ainsi que celles traitées avec 100nM de DRB pour les temps 0.5H, 1H et 2H ont été fixées avec 4% PFA et sont marquées avec 1ug/ml

de Hoechst. Les images sont prises par pile sur l'axe Z à un intervalle de 0.24 micron et celles illustrées représentent une coupe d'environ 3 microns. L'acquisition est faite à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

<i>Paramètres</i>	CTRL	Traitement DRB (100uM)		
<i>Temps (H)</i>	<i>0H</i>	<i>0.5H</i>	<i>1H</i>	<i>2H</i>
<i>Noyau sans granules (%)</i>	77	62	57	51
<i>Noyau avec granules (%)</i>	27	38	43	49
<i>Nombre de granules/noyau</i>	1-3	2-7	3-10	3-10

Tableau 2. – Comparaison du nombre de granules entre DRB et CTRL.

Le nombre de cellules utilisées pour la quantification du nombre de granules par cellule est N=137 et N=143 pour les CTRL et DRB respectivement.

Comme nous pouvons l'observer dans la figure 17a, en absence de l'inhibiteur, les noyaux des cellules présentent un nucléoplasme relativement dépourvu de granules de TPR. Environ 30% des cellules contrôles possèdent en moyenne 1 granule (fig17b) pour un maximum allant jusqu'à 3 granules par noyau. Lorsque la transcription est inhibée, le changement le plus remarquable est le nombre de granules dans les cellules traitées avec DRB qui semblerait augmenter avec la durée de l'inhibition. En effet, un traitement de 0.5H avec DRB avant la fixation des cellules montre que les cellules forment des granules dans le noyau de taille similaire ou plus grand que ceux observés dans le contrôle. Le pourcentage de cellules présentant des granules est de 38% pour une moyenne de 2 par cellule avec un intervalle de 2-7 (tab.2).

Pour les incubations de 1h et 2h, le pourcentage de cellules avec ce phénotype est de 43% et 49% respectivement avec la moyenne du nombre de granules restant similaire autour de 3 granules par cellule pour un maximum de 10 (tab.2). La différence observée au-delà d'une heure de traitement est principalement la taille des granules. Ces dernières semblent avoir un diamètre plus large que celles observées dans le contrôle et l'incubation de 0.5H. Ainsi, nos observations à la suite du traitement de DRB suggèrent que l'inhibition de la transcription via Pol-II semble avoir un effet sur la localisation de TPR en induisant la formation de granules. Ceci semble principalement affecté la fraction nucléoplasmique TPR, sachant qu'aucune différence évidente dans la fraction liée au NPC n'a été observée, cependant, cela n'a pas été quantifié. Cependant il

reste encore à déterminer comment l'inhibition de la transcription médiée par DRB affecte la dynamique de TPR. De plus, nous ne savons pas encore ce que sont ces granules de TPR et s'ils contiennent d'autres protéines.

4.3.2. Dynamique de la formation des agrégats contenant TPR dans le noyau

DRB est un inhibiteur de transcription qui agit rapidement lorsqu'il est ajouté aux cellules visées. En prenant en compte son temps d'action, nous avons voulu suivre l'évolution de la localisation et la dynamique de TPR dans le nucléoplasme dans des cellules vivantes. Vu que pour une IF, il est nécessaire de fixer les cellules avant de pouvoir les observer au microscope, nous avons essayé de montrer si le phénotype observé précédemment est unique à la présence de DRB et non liée à la fixation des cellules.

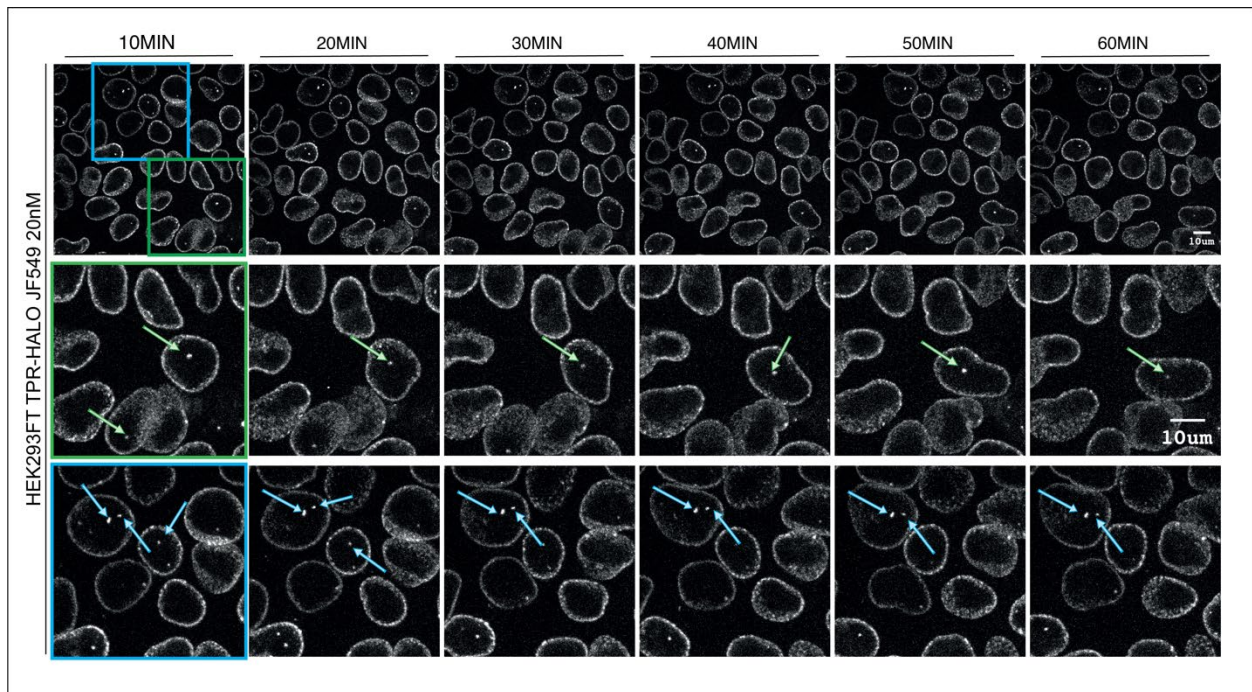


Figure 18. – TPR est présente dans le noyau sous forme de granules.

Les cellules sont marquées avec le ligand JF549 à 20nM avant la prise d'images. L'acquisition se fait à l'aide d'une pile sur l'axe Z à un intervalle de 0.2 micron et chaque image illustrée représente une coupe d'environ 3 microns dans le noyau. Celles-ci sont prises chaque 10min sur les régions sélectionnées. Les flèches montrent la présence de granules dans les cellules, en moyenne 1-2 par noyau. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal.

Ainsi, les cellules de la lignée cellulaire TPR-Halo ont été marquées avec 20nM du ligand JF549. Cette concentration assure une bonne qualité d'image et diminue le bruit de fond. Nous avons donc décidé d'utiliser un microscope de cellule vivante à disque rotatif pour suivre l'évolution de plusieurs régions du pétri de cellules à travers différents intervalles de temps. L'acquisition des piles images est faite chaque 10 minutes, pour permettre la préparation de l'expérience au niveau du logiciel Zen du microscope. Les images obtenues ont été rassemblées pour représenter 3um de la cellule en excluant les bordures supérieures et inférieures du noyau pour diminuer le bruit de fond, comme mentionné précédemment dans la figure 18. Lorsque nous imageons les cellules CTRL ne contenant pas l'inhibiteur de la transcription, nous pouvons observer que les cellules ne changent pas significativement même au-delà d'une heure d'imagerie (fig.18). Également, le nombre de granules reste constant dans les cellules ainsi que leur taille. Ceci suggère que la population de TPR dans le noyau ne change pas significativement dans le temps dans les cellules CTRL.

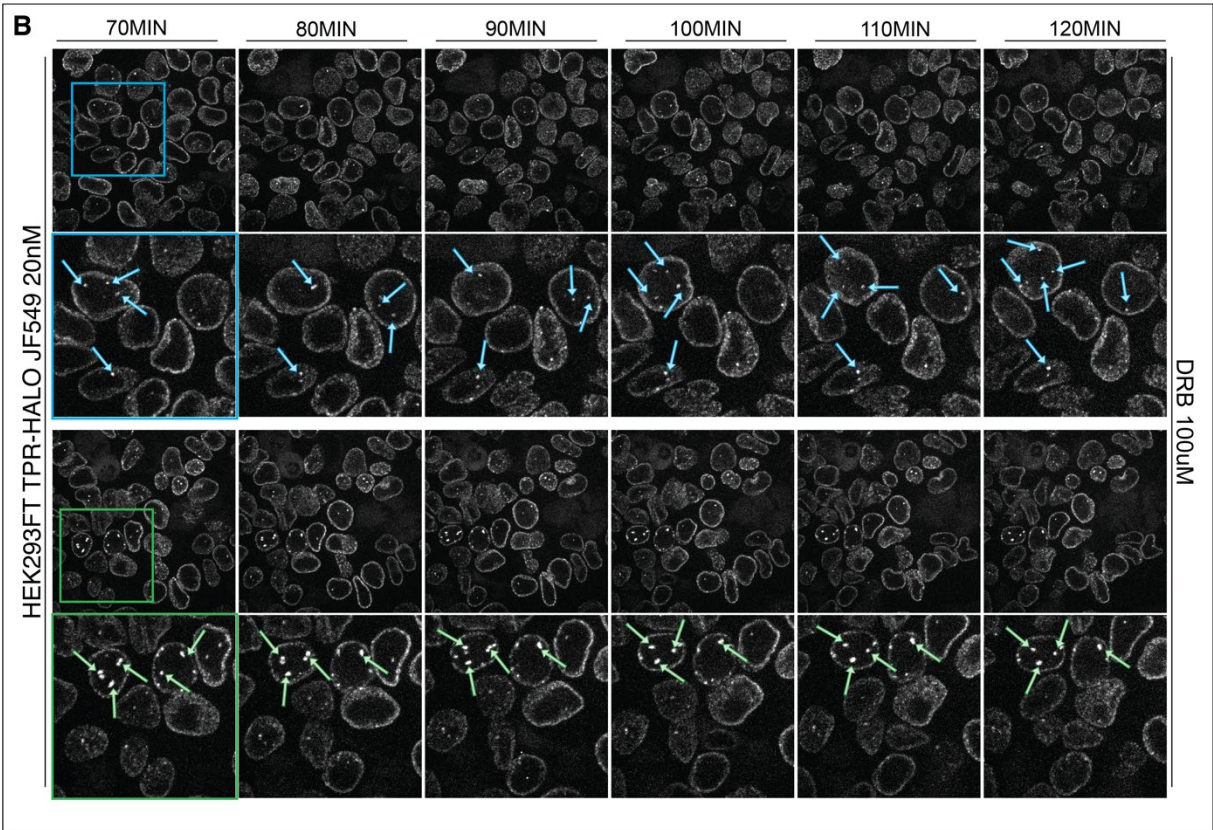
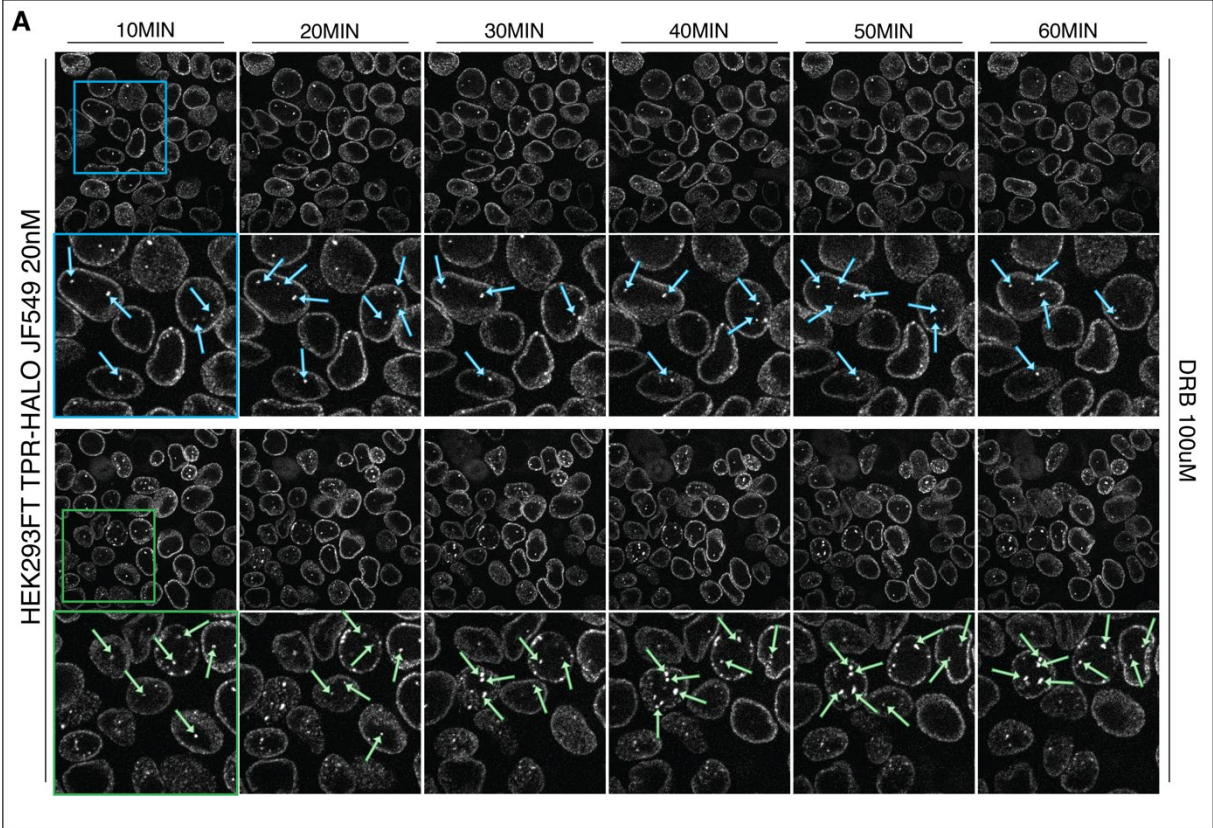


Figure 19. – L'inhibition de la transcription Pol-II affecte la distribution des granules de TPR. Les cellules sont d'abord marquées avec 20nM du ligand JF549 et 100uM de DRB est ajouté au milieu avant l'acquisition. Les images sont prises à des intervalles de 10min pendant 2h sur l'axe Z et chacune d'elles représente une coupe d'environ 3 microns du noyau. Deux champs sont illustrés en bleu et en vert. Les flèches pointent vers les granules présentes. A et B représentent les intervalles de 10 à 60min et de 70 à 120min respectivement. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal.

Ensuite, nous avons mené la même la même expérience pour les cellules TPR-Halo + 20nM JF549 en rajouter 100uM de DRB dans le milieu juste avant l'acquisition. En se basant des expériences précédemment menées pour identifier le temps d'action de DRB, nous avons déterminer que cet inhibiteur ne commence à avoir un effet sur les cellules qu'à partir de 15 minutes. Par conséquent, les images ont été prises à partir de 10 minutes de traitement à cause des limites de préparation de l'expérience. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 19a, entre 10 et 20min, les cellules présentent des granules dans le noyau mais restent en moyenne similaire avec celles des CTRL. À partir de 30min de traitement, nous observons une augmentation progressive du nombre de granules ainsi que des mouvements des granules dans le noyau. Ceci n'est pas observé dans le contrôle, suggérant que l'inhibition de la transcription affecterait potentiellement la dynamique des granules. Cependant, nous n'avons pas mené une étude quantitative pour appuyer cette possibilité.

Au-delà d'une heure de traitement, les principales observations restent autour du nombre de granules mais également leur taille. Comme mentionné précédemment, les cellules contrôles, bien qu'elles puissent avoir des granules sans inhibition de la transcription, ne présentent pas un phénotype similaire à celles traitées avec l'inhibiteur DRB. En effet, leurs granules restent de taille similaire au cours de la période d'acquisition. Ceci suggère donc que DRB induirait la formation de granules de TPR dans les noyaux des cellules en affectant l'abondance des granules présentes et leur taille. Lorsque les images sont maintenues au-delà d'une heure (fig.19b), le nombre de granules ainsi que leur taille reste relativement constant jusqu'à 2h où nous arrêtons l'acquisition en raison des risques de phototoxicité. En prenant en compte chacun des résultats que nous avons observés, nous suggérons que DRB a effectivement un effet sur la population de TPR dans le nucléoplasme en affectant sa distribution en formant des granules dont la taille évolue selon la durée du traitement. Vu que cet inhibiteur agit sur le métabolisme des ARNs au niveau de la

transcription, il est intéressant de s'interroger sur l'effet de l'inhibition de la transcription via Pol-II sur les différentes populations de TPR précédemment observées par microscopie à molécule unique.

4.4. L'inhibition de la Pol-II affecte les populations de la fraction nucléoplasmique de TPR

4.4.1. L'inhibition de la Pol-II cause une baisse de la diffusion des molécules de TPR nucléoplasmique

Comparaison de la distribution des coefficients de diffusion en présence et en absence de DRB

La protéine TPR possède une population nucléoplasmique présentant différentes caractéristiques de diffusion et de confinement. Les variations entre ces populations suggèrent une hétérogénéité et potentiellement une diversité dans leurs fonctions, si présentes, dans le noyau. De plus, lorsque la transcription est inhibée via Pol-II, nous observons une accumulation de TPR dans des granules nucléoplasmiques en fonction de la durée d'inhibition. Cependant, ceci n'est pas observé dans toutes les cellules. La présence de DRB dans le milieu de culture des cellules affecte la distribution de TPR en formant des agrégats environ 30min après addition de DRB, préférentiellement pour les cellules présentant des granules. En prenant cela en compte, il serait intéressant d'étudier les effets qu'un traitement avec cette drogue pourrait avoir sur les sous-populations de TPR que nous avons caractérisé à la suite de microscopie à molécule unique.

Pour déterminer les effets de l'inhibition de la transcription sur les sous-populations nucléoplasmiques de TPR, nous avons marqué les cellules TPR-HALO avec 250nM du ligand paJF549 et avons ensuite rajouté 100uM de DRB dans le milieu avant l'acquisition des images au microscope. Le processus est le même que celui précédemment décrit plus haut (1.3) et les images sont prises à des intervalles de 10min en raison des limitations sur la mise en place de l'expérience. Nous avons également utilisé des cellules ne contenant pas l'inhibiteur DRB comme contrôle prise de manière similaire pour la comparaison des résultats. Les images sont ensuite analysées par la même méthode décrite plus haut, suivant le protocole de Lerner et al, pour maintenir la fidélité de

l'analyse. Les trajectoires analysées pour l'inhibition de la transcription correspondent à un traitement avec 100uM de DRB pendant 110min à 10min d'intervalle entre chaque série d'images. Les temps d'exposition de 12ms et 20ms ont été choisis pour une meilleure identification des différences entre les deux conditions. Pour maintenir la cohérence des résultats, nous limitons les erreurs de représentation des sous-populations en présence de DRB en excluant les 20 premières minutes de traitement. De plus, le nombre de trajectoires analysées pour chaque condition, soit DRB et CTRL, se trouve dans des proportions similaires.

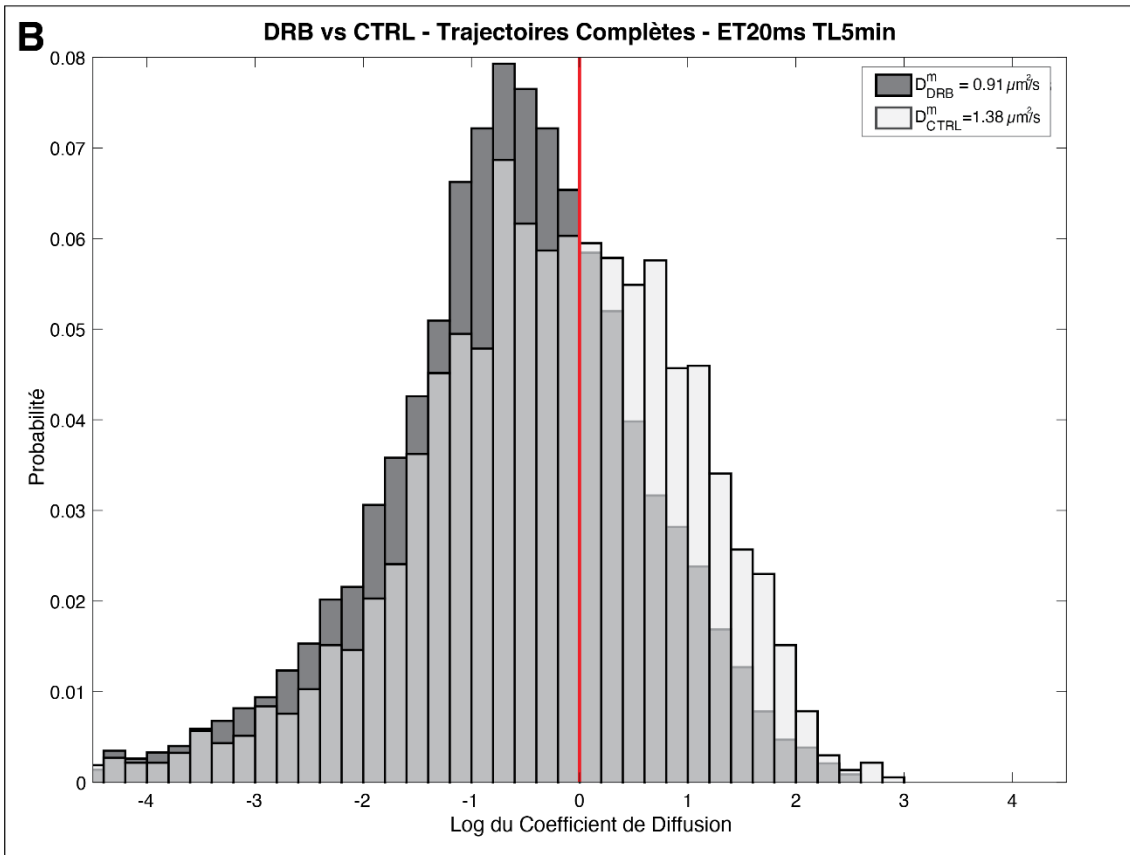
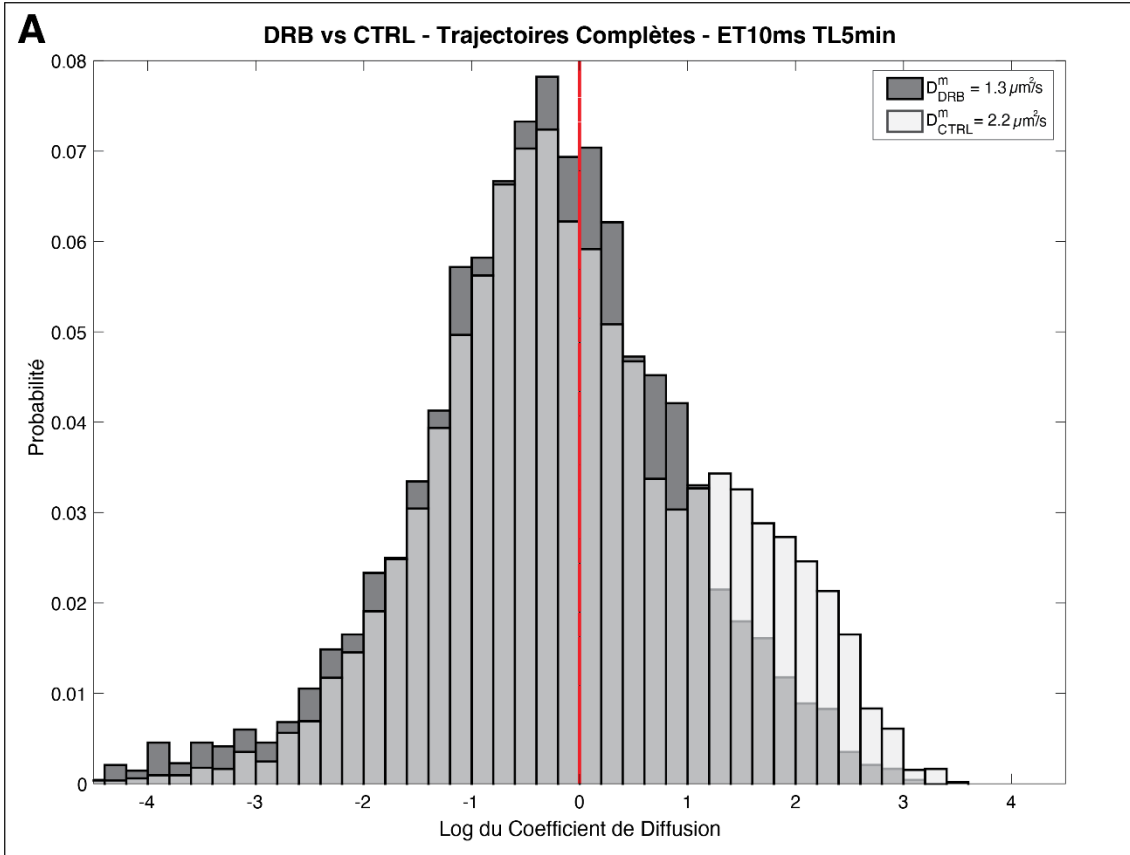


Figure 20. – Comparaison des coefficients de diffusion de la population nucléoplasmique de TPR en présence de DRB.

(A) Le diagramme représente toutes les trajectoires pour un temps d'exposition (ET) de 10ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(\text{Ctrl}) = 2.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(\text{DRB}) = 1.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (B) Le diagramme représente toutes les trajectoires pour un ET de 20ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(\text{Ctrl}) = 1.38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(\text{DRB}) = 0.91 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Chacune des trajectoires contient 5 points minimum.

Pour notre analyse, nous comparons d'abord la distribution des coefficients de diffusion de toutes les trajectoires des cellules DRB et des CTRL, pour un temps d'exposition de 10ms. Pour les cellules CTRL (fig.20a), nous observons une distribution présentant 2 pics, correspondant aux coefficients de diffusion d'environ de 4 et $0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Également, leur coefficient de diffusion moyen étant de $2.2 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 3.3$ suggère une influence de la population en diffusion rapide sur cette moyenne. Dans le cas des cellules traitées avec DRB, nous observons un pic principal correspondant à un coefficient de diffusion d'environ $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Contrairement aux cellules CTRL, les populations en diffusion rapide semblent être réduites, avec une prévalence préférentielle pour les trajectoires avec une diffusion intermédiaire à lente.

De plus, le coefficient de diffusion moyen de la condition DRB est de $1.3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 2.1$, représentant une baisse de 50% par rapport aux contrôles. Ceci représente une différence significative en termes de diffusion de molécules cellulaires. Cependant ceci représente une étude qualitative de la différence entre le CTRL et DRB. Lorsque le temps d'exposition est de 20ms (fig.20b), les CTRL présentent une distribution relativement similaire, avec une perte de la définition du pic de la fraction rapide, pour une valeur d'environ $1.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$. La fraction en diffusion intermédiaire et lente ne semble pas particulièrement affectée, à l'exception d'un pic défini pour un coefficient de diffusion d'environ de $0.55 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Pour les cellules DRB, une distribution similaire est observée, avec la représentation d'une fraction en diffusion lente aux alentours de $0.45 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Une baisse similaire du Df moyen des trajectoires DRB par rapport aux CTRL est également observée pour un temps d'exposition 20ms, avec $Df(\text{DRB})=0.91 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(\text{CTRL})=1.38 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ainsi, en prenant en compte ces résultats, nous supposons que l'inhibition

de la transcription aurait un effet sur la sous-population nucléoplasmique de TPR en diffusion rapide.

Comparaison de la distribution de chaque type de trajectoires avec ou sans DRB

Notre première analyse comparative suggère une réduction de la diffusion rapide de TPR nucléoplasmique lorsque la transcription est inhibée. Cependant, la distribution de l'ensemble des coefficients de diffusion des cellules CTRL et DRB ne nous permet pas d'indiquer quel type de trajectoire est affecté par un traitement avec DRB. Ainsi, pour identifier les sous-populations de TPR nucléoplasmique affectées par une inhibition de la transcription via Pol-II, nous avons comparé la distribution des coefficients de diffusion chacun des types de trajectoires précédemment caractérisés pour les conditions CTRL et DRB pour un temps d'exposition de 10ms. Pour les trajectoires *confinées*, le coefficient de diffusion moyen pour le traitement avec DRB et pour le contrôle ne semble pas être affecté par l'inhibition de la transcription; avec comme valeurs $Df(CTRL) = 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.12$ et $Df(DRB) = 0.18 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.14$. Leur distribution reste similaire et se chevauche, suggérant qu'il n'y a pas de changement majeur en termes de diffusion des trajectoires *confinées* en présence de DRB (fig.21a).

Paramètre	Df moyen - m ± var		Df - rapide		Df - lente	
	CTRL	DRB	CTRL	DRB	CTRL	DRB
Confinée	0.17 ± 0.12	0.18 ± 0.14	ND	ND	0.18	0.18
Brownienne	1.39 ± 1.67	1.23 ± 1.17	3.67	1.35	0.61	0.74
Restreinte	0.79 ± 0.99	0.64 ± 0.55	1.82	1.49	0.61	0.45
Dirigée	4.46 ± 4.8	3.27 ± 3.4	11	2.23	0.91	1.22

Tableau 3. – Comparaison de la diffusion entre les conditions DRB et CTRL.

Le nombre de cellules utilisées pour la quantification du nombre de granules par cellule est N=137 et N=143 pour les CTRL et DRB respectivement.

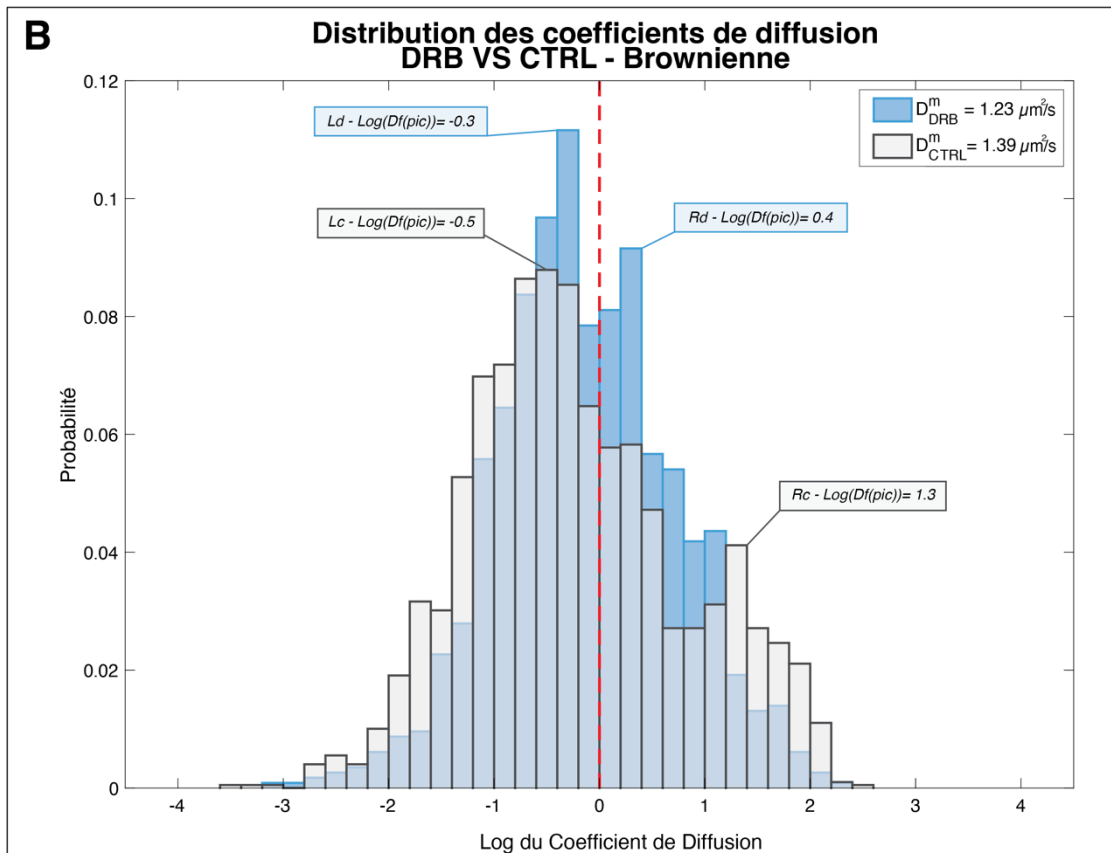
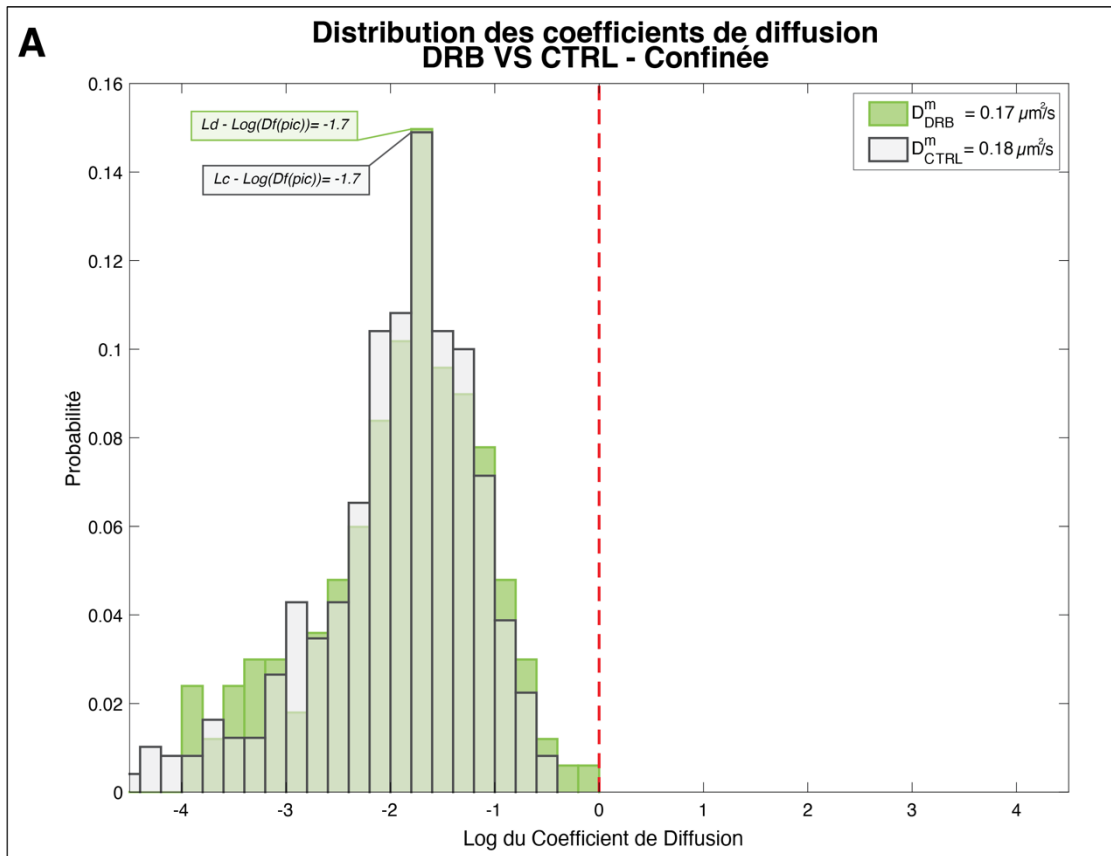


Figure 21. – Comparaison des coefficients de diffusion des trajectoires *confinées* et *browniennes* de TPR nucléoplasmique.

(A) Le diagramme représente les trajectoires *confinées* pour un ET de 10ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(CTRL) = 0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(DRB) = 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (B) Le diagramme représente les trajectoires *browniennes* pour un ET de 10ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(CTRL) = 1.39 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(DRB) = 1.23 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Chacune des trajectoires contient 5 points minimum.

Dans le cas des *trajectoires browniennes*, nous pouvons observer deux pics pour le contrôle et pour DRB. Nous avons d'abord une fraction des trajectoires *browniennes* en diffusion lente avec un coefficient de diffusion d'environ $0.61 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour le contrôle et $0.74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour DRB. Cette sous-fraction serait représentative des molécules de TPR en diffusion lente dans le nucléoplasme. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une grande différence de valeur, il est intéressant de noter que le pic pour DRB semble plus défini par rapport au contrôle, ce qui pourrait indiquer un effet sur la diffusion lié à l'inhibiteur. De plus, nous remarquons que la sous-fraction des trajectoires en diffusion rapide/intermédiaire présente dans le contrôle, avec un Df d'environ $3.67 \mu\text{m}^2/\text{s}$ est partiellement réduits dans la distribution des trajectoires du traitement avec DRB, avec une valeur de $1.35 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Leurs coefficients de diffusion moyens sont $Df(CTRL)=1.39 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 1.67$ et $Df(DRB)=1.23 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 1.17$, suggérant une légère baisse en présence de DRB. Ainsi, ces observations suggèrent que l'inhibition de la transcription via Pol-II réduit la dynamique de la sous-populations de TPR en diffusion *brownienne* rapide (fig.21b)(tab.3).

Une tendance similaire est observée pour les trajectoires *restreintes* avec une baisse de la sous-fraction correspondant aux molécules en diffusion rapide (fig.22a). En effet, ces dernières ont un pic représentant un coefficient de diffusion de $1.82 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les contrôles et $1.49 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les cellules dont la transcription est inhibée. La sous-fraction en diffusion lente présente des pics pour des valeurs de coefficient de diffusion d'environ $0.61 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $0.41 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les CTRL et les DRB respectivement. Leurs coefficients de diffusion moyens sont $D_f(\text{CTRL})=0.79 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.99$ et $D_f(\text{DRB})=0.64 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.55$, démontrant une réduction de la diffusion de l'ensemble des trajectoires *restreintes* lorsque nous traitons les cellules avec DRB (tab.3). En prenant en compte ces résultats, nous suggérons que les molécules de TPR représentées par les trajectoires *restreintes* subissent une réduction de leur diffusion dans le nucléoplasme en absence de transcription.

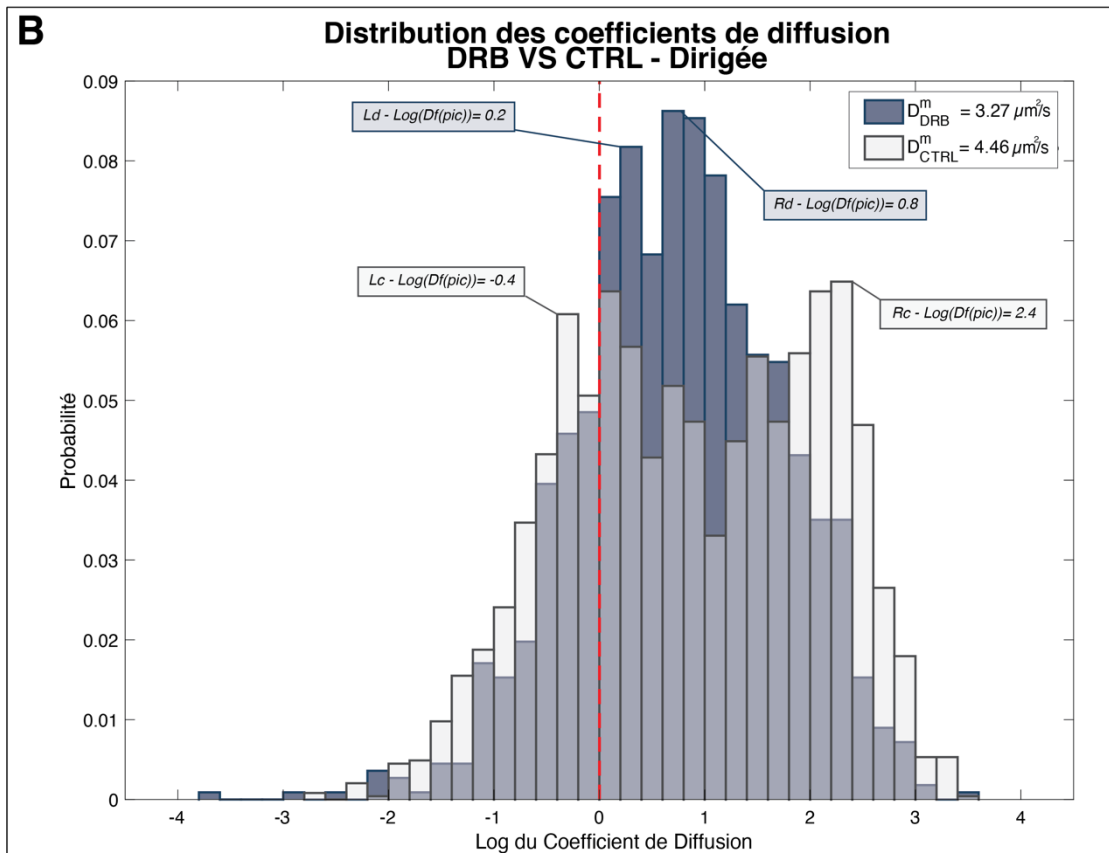
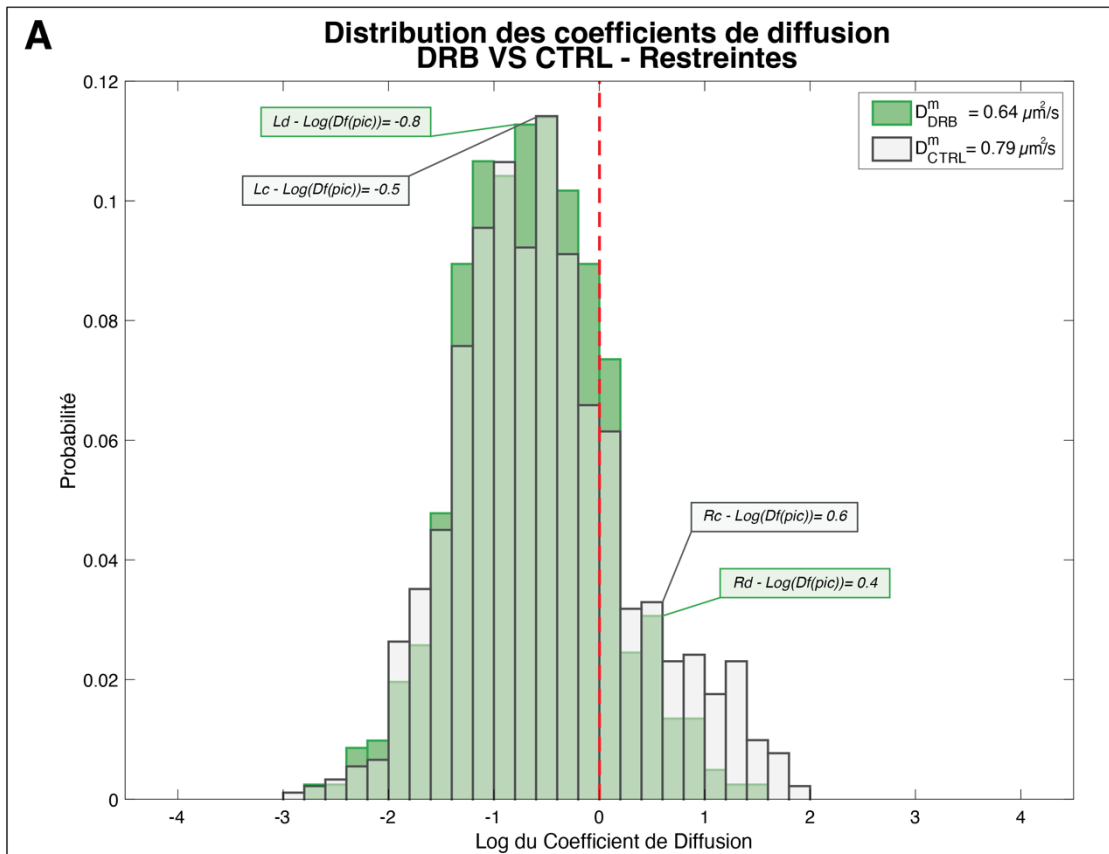


Figure 22. – Comparaison des coefficients de diffusion des trajectoires *dirigées* et *restreintes* de TPR nucléoplasmique.

(A) Le diagramme représente les trajectoires *dirigées* pour un ET de 10ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(\text{Ctrl}) = 4.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(\text{DRB}) = 3.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (B) Le diagramme représente les trajectoires *restreintes* pour un ET de 10ms en conditions CTRL et avec traitement DRB. Les moyennes des coefficients de diffusion pour le contrôle et le traitement avec DRB sont $Df(\text{Ctrl}) = 0.79 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $Df(\text{DRB}) = 0.55 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Chacune des trajectoires contient 5 points minimum.

La différence la plus importante lors de la comparaison entre les cellules contrôles et celles traitées avec DRB est observée dans les trajectoires *dirigées*. En effet, deux pics distincts définissent cette sous-population de TPR. Comme l'illustre la figure 22a, la distribution des contrôles met en évidence deux pics dont les coefficients de diffusion correspondent à $0.91 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour la sous fraction en diffusion intermédiaire et $11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour celle en diffusion rapide (tab.3). Cependant, en présence de l'inhibition de la transcription via Pol-II, nous remarquons que les sous fractions se retrouvent dans un intervalle plus restreint. La sous fraction en diffusion intermédiaire, dans la condition DRB, correspond à environ $1.22 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et semble être enrichi (tab.3).

En revanche, nous remarquons un décalage de la sous-fraction en diffusion rapide vers la sous-fraction en diffusion lente, avec un coefficient de diffusion approximatif de $2.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ceci représente une baisse significative de la dynamique des molécules de TRP dans le nucléoplasme. De plus, leurs coefficients de diffusion moyens sont $Df(\text{CTRL})=4.46 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 4.8$ et $Df(\text{DRB})=3.27 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 3.4$, illustrant une baisse significative de la sous-fraction en diffusion rapide ou facilitée en présence de DRB (tab.3). Ainsi, en considérant nos résultats, nous suggérons que l'inhibition de la transcription via Pol-II à l'aide de DRB cause une baisse de diffusion des molécules de TPR, plus particulièrement celles correspondant aux trajectoires *dirigées*. Ces observations sont en concordance avec nos résultats obtenus suggérant que le traitement avec DRB affecte la distribution de TPR en formant des granules nucléoplasmiques.

4.4.2. L'inhibition de la transcription affecte le pourcentage des sous-populations de TPR nucléoplasmique

Afin d'identifier les populations affectées avec l'inhibition de la transcription à travers Pol-II, nous avons comparé les pourcentages de chaque type de trajectoires pour le contrôle et pour DRB. Les temps d'exposition de 10ms et 20ms ont été choisis car elles montrent une meilleure représentation des différentes populations. Pour le temps d'exposition de 10ms (fig.23), nous constatons que le pourcentage des trajectoires *browniennes* semblent inchangé lorsque l'inhibiteur de la transcription est présent. En revanche, les trajectoires *dirigées* démontrent une baisse d'environ 8% en comparant les CTRL et les DRB. De plus, les trajectoires confinées semblent être légèrement diminuées dans les cellules traitées avec DRB, avec un pourcentage de 6.7% pour le contrôle et 5.9% pour celles traitées. En outre, les trajectoires *restreintes* et les *Butterfly* indiquent une augmentation de leur pourcentage lors de l'inhibition de la transcription via Pol-II, notamment un gain d'environ 6% et 3% respectivement. En prenant en compte ces observations et les résultats précédemment présentés, nous supposons que l'inhibition de la transcription affecte les sous-populations de TPR en limitant leur diffusion dans le nucléoplasme. La baisse du pourcentage des trajectoires *dirigées*, ainsi que de leur coefficient de diffusion, suggèrent que cette sous-population de TPR pourrait être impliquée dans le métabolisme de transcription cellulaire. Ceci est appuyé par une augmentation du pourcentage des trajectoires *restreintes* dans les cellules traitées avec DRB.

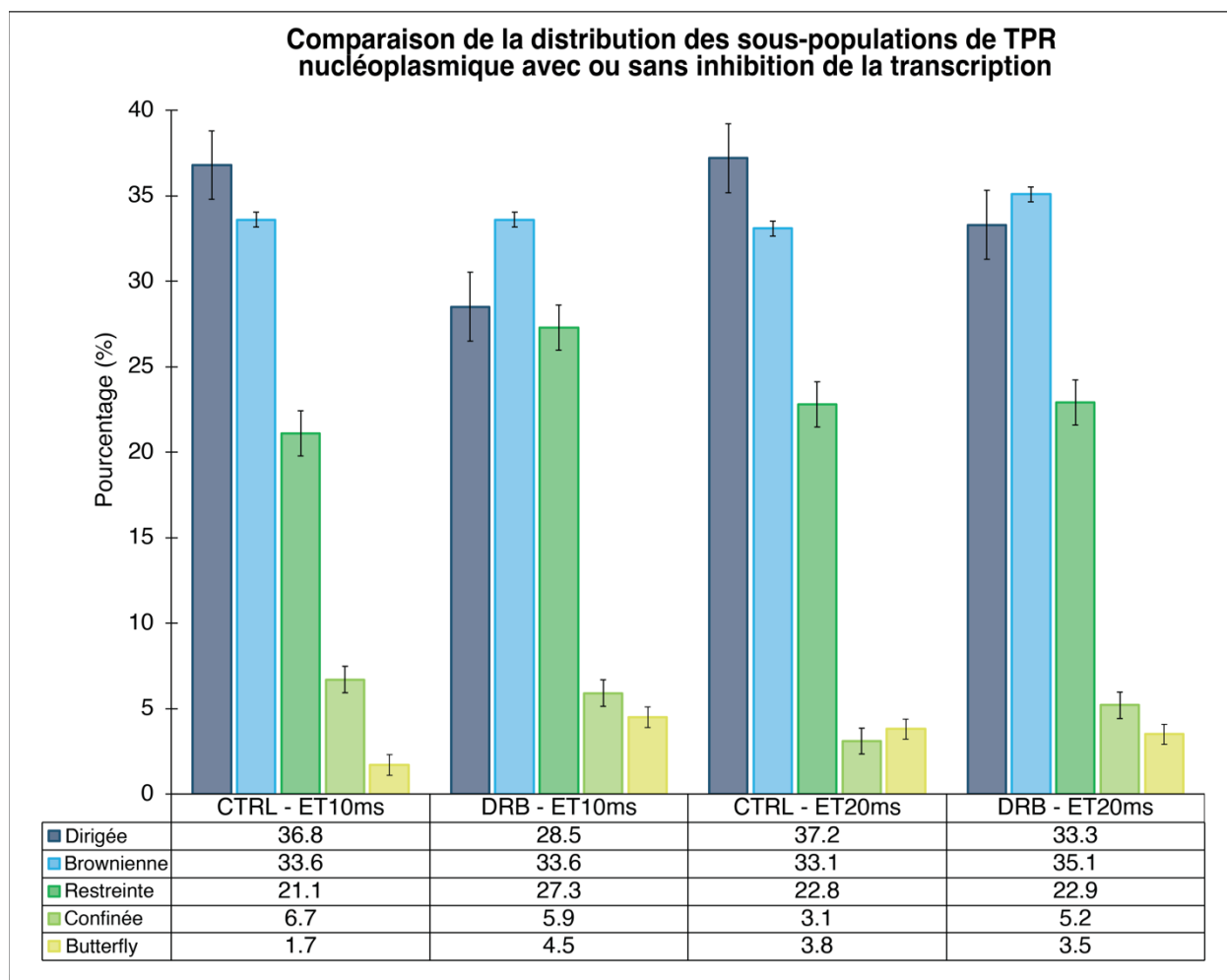


Figure 23. – Distribution des sous populations de TPR en présence de DRB.

Les pourcentages des sous-populations de TPR avec ou sans DRB selon de type de trajectoires sont représentées. Les valeurs correspondent à la distribution des trajectoires selon le temps d'exposition (10ms ou 20ms) en présence de 100uM DRB et dans le contrôle non traitées.

Pour mieux caractériser les différences de pourcentages en présence ou en absence de DRB, nous avons également analysé la distribution des sous-populations de TPR pour un temps d'exposition de 20ms (fig.23). Ce dernier privilégie les trajectoires les moins dynamiques, et permet de refléter des différences entre les trajectoires avec une diffusion intermédiaire et lente. Nous remarquons une légère baisse du pourcentage des trajectoires *dirigées* soit environ 4%, ainsi qu'une légère augmentation pour les trajectoires *browniennes* et *confinées*. Les trajectoires *restreintes* sont inchangées, de même que les *Butterfly*. En considérant ces observations, nous

supposons que l'absence de différence majeure de pourcentage pour les trajectoires *dirigées* et *restreintes* suggère que les molécules de TPR affectées lorsque de l'inhibition de la transcription représentent principalement la sous-population en diffusion intermédiaire à rapide.

4.4.3. Le traitement avec DBR cause un enrichissement des populations de TPR dans une zone restreinte

Pour une caractérisation plus poussée de l'effet de l'inhibition de la Pol-II sur la distribution des molécules de TPR dans le nucléoplasme, nous avons analysé la densité des populations selon leur rayon de confinement et leur déplacement, en référence avec le protocole de Lerner et al (fig.24). Ce diagramme permet d'avoir une meilleure compréhension de la distribution et de la mobilité des populations de TPR nucléoplasmiques analysée en fonction de leur confinement et du déplacement. Ainsi les populations en dessous de 100nm pour le déplacement et pour le confinement représentent les molécules liées à la chromatine. Au-delà de 100nm, les populations représentent les protéines potentiellement liées à des complexes dynamiques ou en diffusion libres. Ainsi, nous utiliserons ce contrôle étudié comme référence pour définir les sous-populations de TPR nucléoplasmique.

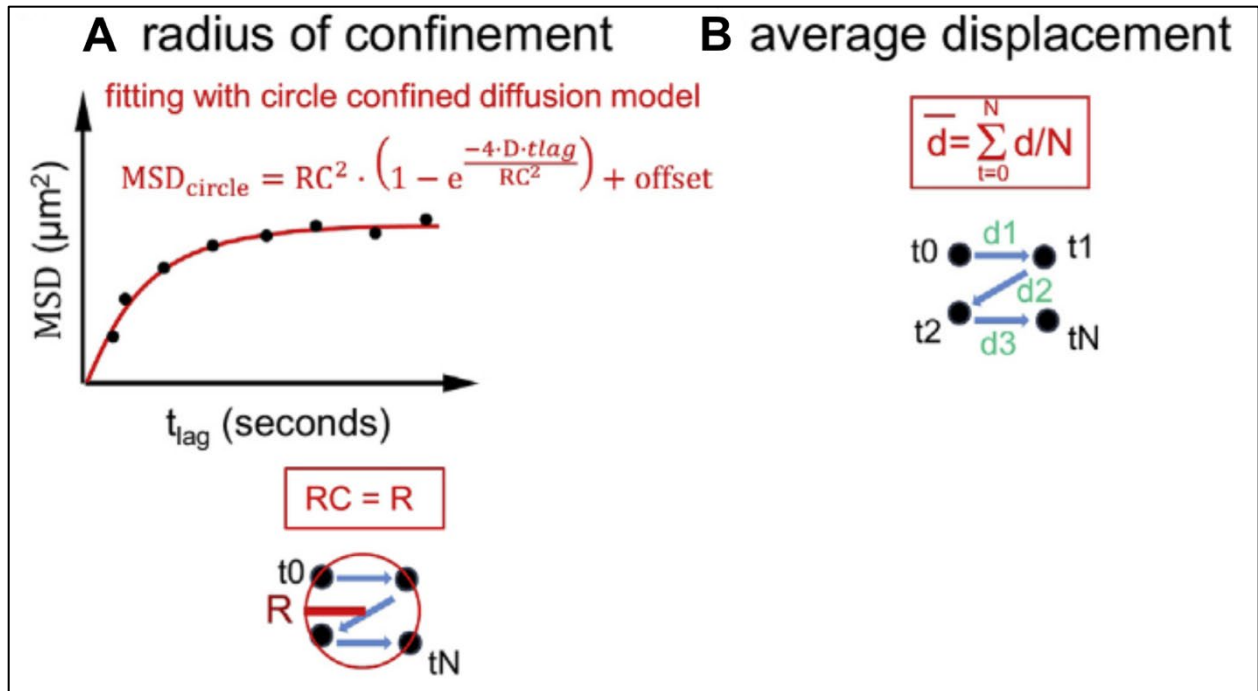


Figure 24. – Deux paramètres de mobilité sont évalués pour des trajectoires confinées. (A) Le rayon de confinement est mesuré en ajustant des courbes T-MSD individuelles avec un modèle de diffusion confiné en cercle et estime le cercle englobant la zone de mouvement. (B) Le déplacement moyen correspond à la distance euclidienne moyenne entre deux positions consécutives de la molécule dans la zone de mouvement ⁷⁵.

Pour les populations du contrôle (fig.25a), nous pouvons observer qu'une majeure partie des populations se retrouve dans le quadrant correspondant à un déplacement/saut et un rayon de confinement d'environ 300nm. Les points observés au-delà de ces valeurs ne forment pas de groupe et ne semblent pas avoir une position précise lorsque les paramètres précédemment cités sont pris en compte. En prenant en compte cette distribution, nous supposons que les points représentés avec une intensité en dessous de 0.2 correspondent aux molécules de TPR dans le nucléoplasme en diffusion libre ou rapide. Également, avec les observations obtenues de la caractérisation de TPR nucléoplasmique, nous suggérons que cette vaste distribution pourrait correspondre aux trajectoires avec une population en diffusion rapide et non confinée, soient 30% des *browniennes* et 40% des *dirigées*.

Lorsque nous limitons le diagramme de densité à 350nm pour le déplacement et le rayon de confinement, nous constatons qu'il existe une population dans le quadrant en dessous de 100nm pour les deux paramètres, dont l'intensité est d'environ 0.6 (fig.25a, Z1). En prenant en compte le contrôle utilisé dans Lerner et al, nous supposons que cette population représente l'ensemble des trajectoires *confinées* et potentiellement une fraction des trajectoires *restreintes*, dont le déplacement est limité. Ces dernières pourraient représenter la fraction de TPR liée à la chromatine comme le suggère le contrôle.

Ensuite, nous avons une zone autour 90nm pour le déplacement mais dont le rayon de confinement est d'environ 110nm. Celle-ci représente une des populations principales en termes de densité avec une intensité entre 0.8-0.9 (fig.25a, Z2). Leur disposition et leur intensité suggèrent qu'une fraction importante des trajectoires analysées se retrouvent dans cette catégorie. En considérant nos précédents résultats, nous supposons que cette population pourrait correspondre à la fraction des trajectoires *restreintes* avec un déplacement restreint mais avec une diffusion intermédiaire. Une partie des trajectoires *browniennes* pourraient également être classée dans cette catégorie en prenant en compte qu'elles présentent une fraction en diffusion intermédiaire et avec un confinement.

Enfin, nous avons la population la plus abondante avec une intensité 0.9-1, dont la zone est comprise entre un rayon de confinement d'environ 140nm et d'un déplacement de 120nm (fig.25a, Z3). Celles-ci correspondraient à la fraction des trajectoires les plus fréquentes en termes de pourcentages et qui ne sont pas *confinées*. En prenant en compte le graphe et nos précédentes observations, nous suggérons que la sous-fraction des trajectoires *dirigées* en diffusion intermédiaire représente une majeure partie de cette population.

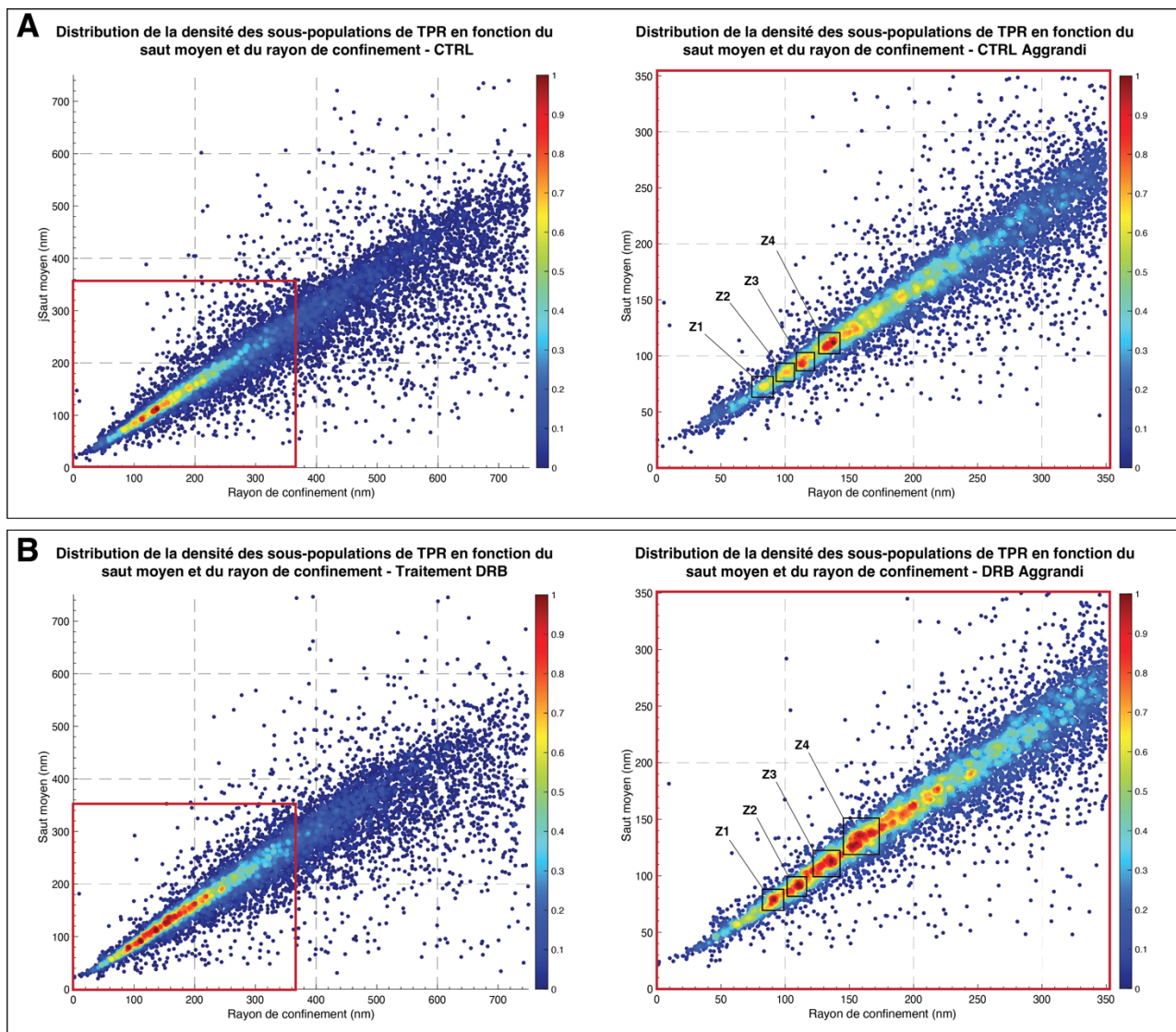


Figure 25. – L'inhibition de la transcription favorise le confinement des sous-populations de TPR. (A) Diagramme de densité du saut moyen par rapport au rayon de confinement pour le contrôle. Le graphe (1) représente l'ensemble des populations selon leur densité. Le graphe (2) est une version agrandie des principales sous-populations avec la plus grande densité. (B) Diagramme de densité du saut moyen par rapport au rayon de confinement après traitement avec DRB. Le graphe (1) représente l'ensemble des populations selon leur densité. Le graphe (2) est une version agrandie des principales sous-populations avec la plus grande densité.

Ces dernières s'étendraient au-delà de cette zone, pour un rayon de confinement de 150-250nm et un déplacement de 120-200nm (fig.25a, Z4). Ceci inclut le nuage de densité avec des intensités plus basses, ce qui serait illustratif des trajectoires *dirigées*. Ensuite, les trajectoires *browniennes* ainsi qu'une fraction des *restreintes* pourraient être représentées dans cette zone en raison de leur abondance. Cette zone suggère une association dynamique et pourrait possiblement représenter les molécules de TPR en association avec des pré-mRNP, des facteurs liés à l'export nucléaire ou aux protéines impliquées dans la maturation de l'ARNm. Ainsi, ce diagramme nous a permis d'identifier 4 zones de densité des sous-populations nucléoplasmiques de TPR et leur potentielle interaction. Cependant une étude plus poussée est nécessaire pour pouvoir caractériser leur interactome.

Ensuite, nous avons analysé la distribution des sous-populations de TPR nucléoplasmique lors de l'inhibition de la transcription avec DRB. En effet, nous remarquons un enrichissement des populations dans le quadrant correspondant à un rayon de confinement et un déplacement compris entre 0-350nm pour chaque paramètre. Dans la figure 25b, nous observons une réduction de la dispersion des points non définis, correspondant aux particules libres. Comme mentionné plus haut, nous supposons que ces dernières correspondent aux trajectoires *dirigées* et *browniennes* principalement. Nos précédentes observations suggèrent que ce nuage correspondrait principalement des trajectoires *dirigées* qui, en présence de DRB, diminue en pourcentage.

De plus, lorsque nous limitons le diagramme à 350nm, nous constatons un enrichissement significatif du signal dans notamment 4 zones dont l'intensité est de 1 (fig.25b). Nous avons d'abord, la sous-population en dessous de 100nm pour le rayon de confinement et pour le déplacement. En comparant son intensité avec le contrôle, nous pouvons noter un enrichissement de cette zone avec une intensité passant de 0.6 à 1 (fig.25b, Z1). Sachant que cette sous-population correspondrait aux molécules de TPR liées à la chromatine, nos précédentes observations et ces résultats suggèrent que l'inhibition de la Pol-II pourrait potentiellement augmenter la sous-population de TPR en diffusion lente et confinée dans le nucléoplasme.

Ensuite, nous avons la sous-population ayant un rayon de confinement d'environ 110nm et un déplacement de 90 approximativement (fig.25b, Z2). Cette zone dans le contrôle représente une population importante avec une intensité de 0.8-0.9, avec comme principales trajectoires les *restreintes* et une partie des *browniennes*. Avec l'inhibition de Pol-II, nous observons une

augmentation de l'intensité, allant de 0.8 à 1, ainsi qu'un léger élargissement de la zone. Ceci est possiblement dû à la hausse du pourcentage des trajectoires *restreintes* dans les cellules traitées avec DRB.

Également, la zone correspondant à la sous-population la plus abondante dans les contrôles est également enrichie dans le traitement avec DRB. En effet, nous remarquons une forte augmentation de l'intensité pour les intervalles de 130-150nm pour le rayon de confinement et 100-120nm pour le déplacement (fig.25b, Z3). En raison de nos précédentes observations, nous supposons que cette zone correspond aux trajectoires *restreintes* et *browniennes* intermédiaires principalement.

Une autre zone très intense est également présente pour les intervalles de 150-170nm pour le rayon de confinement et 120-150nm pour le déplacement (fig.25b, Z4). Lorsque comparée avec le contrôle, nous constatons que cette zone n'était pas présente dans la distribution de la densité en absence de DRB. Avec l'inhibition de la transcription, un enrichissement significatif peut être remarqué avec un large diamètre de la zone de densité. En raison de son absence dans le contrôle et de nos observations lors d'un traitement avec DRB, nous supposons que cette sous-population correspond à la fraction des molécules de TPR, représentées par les trajectoires *dirigées* en diffusion intermédiaire. Ces trajectoires *dirigées* sont enrichies à cause de l'inhibition de la transcription qui réduit la diffusion de la fraction en diffusion rapide ^{85 75}.

5. Discussion

La présence de TPR dans le nucléoplasme dans une fraction non liée au NPC est une observation qui mène à la question suivante : est-ce que cette population jouerait un rôle dans le noyau, plus particulièrement dans le métabolisme des ARNs. Nos résultats de protéomiques préliminaires suggèrent de potentielles interactions avec la machinerie transcription et d'épissage. Afin de caractériser la fraction nucléoplasmique de TPR, nous avons mené une étude en se concentrant sur l'utilisation d'une approche microscopique. Pour étudier une population de molécules diffusant dans le nucléoplasme, une approche de microscopie à molécule unique est une méthode puissante permettant de déterminer les caractéristiques de cette fraction et sa distribution, et de déduire d'éventuels rôles nucléaires de la protéine TPR. Dans cette discussion, je me concentrerai d'abord sur les aspects techniques de la microscopie pour souligner les forces et les faiblesses des différentes approches que nous avons utilisées au cours de ces études, et dans une deuxième section, je me concentrerai sur l'interprétation de nos données par rapport à la fonction possible du TPR nucléoplasmique.

5.1. Mise en place de la méthode de microscopie à molécule unique : atteindre le meilleur ratio S/BF

5.1.1. Spinning Disk vs HILO illumination

Dans le but d'étudier les fonctions possibles de la protéine TPR nucléoplasmique, deux types d'approche microscopique en cellule vivante ont été considérées pour nos études. Nous avons d'abord utilisé le microscope confocal à disque rotatif pour confirmer la présence de fluorescence dans les cellules ainsi que pour faire le suivi des cellules TPR-HALO marquées avec JF549 et traitées avec 100uM de DRB. ^{86 84}.

Ce type de microscope permet d'observer des cellules vivantes à l'aide d'un laser divisé en plusieurs points. Par conséquent, chaque région de l'échantillon d'intérêt est exposée à un rayon

laser de faible intensité pour une courte durée et est également atténuée par le passage au travers du disque rotatif caractéristique du microscope. Ceci présente un avantage car les risques de photoblanchiment et de phototoxicité sont réduits comparativement aux autres approches d'illumination, comme celles étant utilisées dans la plupart des mises en place de microscopie à point laser. Cependant, la faible lumière émise peut être une limitation pour l'utilisation d'approche comme celles de SMT. Pour cette raison, l'étude de la dynamique des molécules uniques de TPR dans le noyau a été réalisée avec une approche microscopique en cellule vivante en combinaison avec une méthode d'imagerie adéquate pour le SMT ⁸⁶.

Les résolutions spatiales et temporelles sont des paramètres clés à considérer pour une analyse SMT. Il est nécessaire de pouvoir différencier deux particules pour obtenir une trajectoire adéquate représentant la diffusion d'une seule molécule. Pour cette raison, l'utilisation de la microscopie à super résolution a été un avantage dans la qualité de la séparation des trajectoires. Comme mentionné plus haut, les approches en SR-SIM et TIRF sont souvent utilisées pour caractériser les paramètres de la trajectoire d'une molécule en cellule vivante ⁸⁶. Cependant, selon l'abondance de la protéine d'intérêt, certaines approches ne sont pas applicables en raison de l'impact négatif sur le ratio S/BR. La protéine TPR est présente en majeure partie au niveau de l'enveloppe nucléaire, en association avec le NPC et forme le panier nucléaire. La stœchiométrie des protéines TPR assemblant le panier est estimée à 8 copies par pore, et nous postulons pour simplifier les analyses que la fraction nucléoplasmique est composée de molécules uniques. Cependant les molécules diffusant dans le nucléoplasme restent trop abondantes pour utiliser des techniques d'illumination classiques. Ainsi, nous avons choisi de poursuivre en utilisant une stratégie d'illumination HILO ⁷⁴.

Avec cette méthode d'illumination, le rayon laser est reflété dans un angle pouvant être ajusté pour restreindre l'illumination à une mince couche de la cellule ⁷⁴. De cette façon, il est possible de limiter la quantité de molécules excitées et d'imager les molécules présentes dans un plan précis de la cellule en permettant ainsi de distinguer l'ensemble des molécules uniques avec une représentation des potentielles sous-populations. De plus, il est important d'optimiser l'angle d'illumination du laser afin d'avoir un bon focus pour l'acquisition d'images.

5.1.2. Choix du marquage pour le suivi des molécules uniques : GFP vs Halo

Une des questions principales lors d'une analyse de molécule unique par microscopie est quel type de marquage utiliser. Le choix de type de fluorophore est important surtout pour le SMT-SR car le marqueur utilisé doit être préférentiellement assez lumineux pour permettre de capturer des particules rapides mais aussi avec un faible photoblanchiment pour pouvoir déterminer une portion de leur trajectoire sur la plus longue durée possible.

La perte de signal lors du suivi d'une molécule unique peut être interprétée de 2 façons différentes : la perte d'émission du marqueur dû à sa déstabilisation par photo blanchiment ou par la sortie de la molécule en diffusion du champ d'illumination. Pour cette raison dans une approche de SMT, afin de mesurer les trajectoires les plus longues possibles, le marqueur choisi doit être le plus stable possible. Par conséquent, les protéines fluorescentes comme GFP ne sont pas favorisées pour les études SMT car leur luminosité et leur photo-stabilité sont trop faibles pour réaliser une analyse adéquate du comportement des molécules suivies ⁷².

Pour cette raison, l'utilisation de la protéine HaloTag est la méthode de marquage la plus favorable pour le SMT. La fusion de la protéine d'intérêt avec le HaloTag permet l'utilisation de différents types de fluorophores couplés avec le ligand HaloTag ⁷⁰. Ceci est un avantage dans la versatilité de son utilisation, car les mêmes protéines fusionnées peuvent être marquées avec différents marqueurs fluorescents ⁶⁹. Cependant, ceci nécessite une étape d'incubation et de lavage avec le ligand fluorophore choisi dans des cellules exprimant la protéine d'intérêt en fusion avec le HaloTag. Un marquage insuffisant peut mener à un mauvais signal; cependant, un marquage sous-stœchiométrique peut être utilisé pour la détection des molécules uniques. De plus, lorsque les cellules ne seraient pas nettoyées lors de l'incubation avec le marqueur, un risque de bruit de fond fluorescent se présente. En effet, les ligands non liés lors du marquage possèdent la même intensité de fluorescence que celles lié avec la protéine fusion Halo Tag. Par conséquent, les étapes de lavages sont cruciales pour s'assurer que le signal soit spécifique à la protéine ⁸⁶.

Pour la microscopie en cellule vivante, la phototoxicité doit être réduite au maximum pour éviter les perturbations métaboliques et la mort des cellules. Les longueurs d'ondes les plus faibles

avoisinant le bleu dans le spectre, sont celles causant le plus de dommages photo-toxiques en raison de la forte absorbance des composants de la cellule dans ces dernières. L'utilisation des marqueurs excités par les lasers émettant dans les longueurs d'onde orange, rouge et infrarouges est donc plus adaptée bien que leur intensité d'émission soit plus basse comparée aux marqueurs excités par des longueurs d'onde de plus forte énergie ⁸⁶. Néanmoins, l'exposition à la lumière mènera éventuellement à des photo-dommages, il est donc préférable de maintenir la lumière d'excitation le plus bas possible. L'illumination HILO aide à réduire les dommages liés à la lumière en illuminant la cellule avec une couche de lumière ⁷⁴.

Parmi les ligands étant disponibles pour le marquage HaloTag, les ligands HaloTag fusionnés avec les marqueurs Janelia Fluor (JF) sont les plus performants et utiles parmi ceux actuellement disponibles ⁸⁰. Ces marqueurs ont été développés pour augmenter leur luminosité par rapport aux générations précédentes de marqueurs. De plus, ils présentent une meilleure photostabilité faisant d'eux un choix idéal pour SR-SMT. Enfin, ces derniers sont plus perméables à la membrane cellulaire par rapport aux anciens marqueurs et sont donc des molécules plus efficaces pour le marquage intra-cellulaire. Il est possible d'obtenir différents types de ces ligands selon la longueur d'onde recherchée ⁸⁰. En prenant en compte toutes ces caractéristiques, ils permettent donc d'imager des cellules pendant une plus longue période avec une meilleure qualité de la fluorescence et moins de phototoxicité. De plus, ces ligands pénètrent également la membrane nucléaire lors de l'incubation préalable des cellules marquées et ont donc été choisis pour le suivi de la protéine TPR ^{86 80}. Le marquage de TPR avec un fluorophore comme le ligand HaloTag ou une protéine fluorescente est principalement faite sur le côté N-terminale. Les fonctions de la protéines sont maintenues lorsque la fusion est au niveau N-terminal, mais pas pour la terminaison C-terminale ⁸⁷.

5.1.3. Marquage sous-stœchiométrique vs photo-activable de TPR

Dans le noyau, les protéines sont souvent très abondantes et marquer toute une population rendrait le suivi de molécule unique impossible. Lorsque nous marquons TPR avec le ligand JF549, il est difficile de pouvoir suivre les molécules dans le noyau car ces dernières sont en forte

concentration. Ainsi, pour limiter le nombre de molécules observées simultanément, nous avons utilisé deux méthodes de marquage pour la caractérisation de TPR.

En premier, nous avons réalisé un marquage dit sous-stœchiométrique des protéines de la lignée TPR-HALO à l'aide du ligand JF549 dans une concentration relativement faible (2-5nM) permettant un marquage d'un nombre limité de protéines. Le marquage sous-stœchiométrique présente un avantage car il permet de limiter la proportion de molécules statiques observées à la périphérie et d'améliorer le ratio S/BF. Cependant, elle ne s'avère pas idéale pour la caractérisation de TPR. En effet, les résultats que nous avons obtenus avec cette approche montrent que nous parvenons effectivement à obtenir les molécules de TPR en mouvement dans le nucléoplasme, mais leur quantité est trop élevée pour l'analyse selon les méthodes prédéfinies de SMT. Ceci pourrait avoir un impact sur notre analyse en biaisant le comportement de la protéine TPR lorsqu'elle n'est pas associée au pore nucléaire. Par conséquent, cette méthode n'a pas été optimisée plus avant pour la caractérisation des sous-populations de TPR

Une autre approche pour optimiser la quantité de molécules observées en même temps et simplifier l'analyse SMT est l'utilisation des ligands JF photo-activables (PA-JF549) ⁸¹. Les PA-JF549 sont compatibles avec les mêmes approches de marquage pour le SR-SMT. Leur activation se fait en utilisant un laser à 405nm avec une faible intensité permettant la libération du ligand alors placé dans un état activé. L'intensité du laser et du temps d'exposition permet d'ajuster le nombre de molécules activées et susceptibles d'être excitées lors d'une seconde exposition ⁸¹. Ceci présente un avantage significatif car nous pouvons limiter le nombre de molécules visualisées durant l'acquisition.

Dans le cas de TPR, nous avons testé plusieurs concentrations de ce ligand pour conclure que notre concentration optimale de ligand est assez élevée (250-500nM) et reste compatible avec une intensité du laser d'activation relativement faible comprise entre 0.005-0.01%. Effectivement, lorsque la concentration de ligand utilisée pour le marquage est faible, le nombre de particules par plan varie approximativement entre 1-3, ce qui représente un nombre trop faible pour une analyse quantitative des trajectoires. En revanche, une faible concentration de ligand lors du marquage représente un avantage pour la réduction du bruit de fond avec une quantité négligeable de ligands libres qui reste faible et un nombre limité de particules activées. Ainsi, pour notre analyse, nous

avons déterminé que la concentration optimale pour le SMT de TPR est de 250nM, ce qui nous permet d'avoir en moyenne 5-10 particules par images et avec une définition plus facile du focus. Pour limiter le bruit de fond, nous faisons plusieurs lavages après le marquage, pour une durée totale de 1H30min, ce qui réduit le nombre de particules libres du ligand et favorise le ratio S/BR. De plus, l'activation aide à déterminer la durée pour laquelle nous pouvons observer une molécule unique, de l'apparition de la fluorescence jusqu'au photoblanchiment. Ceci nous aide donc à faire la différence entre une protéine qui se détache ou quitte le plan.

Cependant, certaines limitations s'appliquent lors de l'acquisition de PA-JF549. Ces ligands sont sensibles à la lumière et peuvent être activés avant la mise en place de la prise d'images au microscope. Par conséquent, le ratio S/BR est affecté en raison des molécules déjà activées sans illumination préliminaire. Pour y remédier, nous utilisons le laser 561nm pour photoblanchir ces molécules activées à faible intensité, avant l'acquisition et l'activation de PA-JF549.

Puisque l'utilisation des ligands photo-activables nécessite une activation avec le laser 405nm pour obtenir la fluorescence, il est difficile de pouvoir identifier les cellules et définir le focus avant l'activation. Afin de pouvoir identifier la périphérie nucléaire et de pouvoir définir le focus et l'angle optimal, nous avons tenté de marquer les cellules TPR-HALO simultanément avec le PA-JF549 ainsi que le JF503, émet dans les longueurs d'onde correspondant au vert. Cette étape était requise pour obtenir une image globale de TPR pour délimiter le noyau. Cependant, la lumière d'activation de ce laser étant 488nm, donc proche de 405nm, a causé une activation préliminaire des PA-JF549 ce qui a réduit la qualité de nos images. Par conséquent, nous avons continué notre approche microscopique uniquement avec le PA-JF549, en utilisant la présence de fluorescence au niveau de l'enveloppe nucléaire avant activation comme un repère.

La présence de fluorescence de TPR lié au NPC ne présente pas un inconvénient majeur pour le suivi de TPR car elle nous permet de trouver les cellules à l'aide des TPR-NPC et d'optimiser le focus et l'angle des lasers d'activation avant le début de l'acquisition. Le nombre de particules par images nous permet d'optimiser la qualité de l'analyse et d'éviter la formation de trajectoires croisées, qui survient lorsque deux particules se rencontrent et divergent. L'utilisation de ces fluorophores avec une méthode d'illumination HILO est donc la meilleure approche pour le SMT pour l'étude de la diffusion de TPR dans le noyau. Il serait intéressant d'optimiser cette

approche en utilisant un ligand dans la lumière infrarouge comme le JF646, pour pouvoir identifier le noyau des cellules, définir le focus, l'angle d'illumination et éviter d'utiliser l'activation préliminaire des PA-JF549 comme repère.

5.1.4. Détection de différentes populations selon leur mode de diffusion

La protéine TPR est liée principalement au niveau du NPC mais possède aussi une fraction en diffusion dans le nucléoplasme. Dans cette population non liée au NPC, nos résultats préliminaires ont montré que différents types de mouvements de TPR avec des sous populations en diffusion rapide, intermédiaire ou diffusion lente voir statique.

Dans le cadre d'étude SMT, une protéine souvent utilisée est la protéine H2B, une protéine liant la chromatine. Cette interaction se traduit alors par l'existence d'une population relativement statique de H2B dans le noyau présentant les caractéristiques d'une population en diffusion lente. De plus, le suivi des molécules unique de H2B montre que les molécules restent généralement confinées dans les régions où elles sont en interaction avec la chromatine ⁷⁵.

Les expériences préliminaires conduites avec H2B-Halo nous ont permis de déterminer que dans le cas d'une molécule statique, confinée et en diffusion lente, la caractérisation du mouvement nécessite un temps d'exposition élevé (30 à 50ms) et des films de plus longue durée (3-5min). En revanche, le désavantage de ce type d'acquisition est le risque du photoblanchiment des cellules et de phototoxicité. Pour éviter cela, la puissance du laser doit être réduite au pourcentage le plus bas possible pour une bonne détection sans affecter les cellules ⁷⁵.

Pour une protéine ayant un caractère dynamique, la diffusion et le confinement sont pris en compte, en plus de la vitesse. Les molécules en diffusion rapide, ou facilité dans un compartiment cellulaire comme le noyau, seront plus difficile à suivre avec fidélité en microscopie. Pour l'acquisition de ces images, le temps d'exposition est le critère le plus important à optimiser pour pouvoir capturer ces molécules. Si une molécule se déplace rapidement et le temps d'exposition est trop long, il sera impossible de détecter les molécules en mouvement rapide à cause du « blurring motion ». Selon le type de microscopie utilisée, ce temps peut être diminué jusqu'à une

certaine limite (5-10ms) pour maximiser le nombre de molécules capturées. La combinaison de l'illumination HILO et des caméras EMCCD nous permettent d'utiliser des temps d'exposition courts tout en maintenant leur habilité à détecter des molécules uniques. De plus, le ratio du signal sur le bruit de fond peut être réduit lorsqu'une vitesse d'acquisition rapide est utilisée, cependant, ceci s'accompagne d'un inconvénient qui pourrait rendre l'analyse des images plus difficile. En effet, plus le temps d'exposition est bas, plus le ratio du signal et du bruit de fond est réduit. Vu que les molécules qui ne sont pas liées à des structures statiques, ou incorporées dans de larges complexes, diffusent rapidement dans la cellule, elles ne peuvent pas être imagées avec autant de précision à cause de leur rapidité.

Donc la méthode de microscopie doit être optimisée pour avoir un temps d'exposition assez bas et une fréquence d'acquisition d'images assez élevée pour pouvoir détecter ces molécules en conservant un ratio signal sur bruit optimal. Contrairement à l'imagerie de molécules lentes, la puissance du laser peut être plus haute pour ce type d'acquisition vu que le temps d'exposition est minimal. Cela permet de favoriser le ratio S/BF et partiellement d'améliorer la résolution. Un inconvénient à prendre en compte est la possible présence de particules du ligand libre dans le noyau. Celles-ci sont très rapide comparé aux valeurs que nous avons obtenues dans la littérature et sont rarement présentes sur le plan suffisamment longtemps pour définir une trajectoire dont les caractéristiques peuvent être analysées ⁷².

En raison de la présence de plusieurs sous populations de TPR dans le nucléoplasme en diffusion, nous avons choisi de faire une analyse en utilisant les temps d'exposition de 10ms et de 20ms afin de capturer l'ensemble des mouvements des particules. Les trajectoires obtenues avec ET10ms permettent d'avoir toutes les populations aussi bien dynamiques que statiques alors que celles obtenues avec ET20ms donnent une meilleure définition des populations en diffusion intermédiaires ou lentes. Les temps d'exposition au-delà de 20ms ont également été testés pour déterminer le temps de résidence des molécules statiques dans le noyau, cependant, celles-ci ne sont pas présentes en grande quantité (données non illustrées). Les images obtenues montrent uniquement les TPR-NPC qui disparaissent après 2-4min, ce qui serait potentiellement à cause du photoblanchiment. Ainsi, la majeure partie de notre analyse a été obtenue avec le temps ET10ms car elle permet de représenter toutes les sous-populations de TPR dans le nucléoplasme.

5.2. Approche méthodologique pour générer les données de SMT de TPR-Halo.

5.2.1. Traitement des images obtenues en microscopie en cellule vivante

Dans le but de caractériser les sous-populations de TPR dans le nucléoplasme, nous avons cherché à identifier les logiciels adéquats pour le traitement des images ainsi que l'analyse des données. Les images obtenues en microscopie ont toutes été traitées à l'aide du logiciel Fiji (Version 2.3.0/1.53q). Ce dernier présente plusieurs options en termes de logiciels annexes permettant une analyse plus raffinée des images. Selon le mode d'acquisition des images et le type d'information recherché comme la distribution d'une protéine dans le noyau ou son déplacement dans le temps, nous avons établi différents protocoles pour notre étude.

Premièrement, nous avons analysé les données obtenues à l'aide de microscopie en cellule vivante avec le confocal à disque rotatif. Il est important de pouvoir comparer les images et qu'elles soient traitées d'une manière similaire pour garantir la consistance des paramètres analysés. Pour réaliser l'analyse présentée dans les figures 17 à 19, nous avons d'abord corrigé le photoblanchiment des cellules. En effet, cette expérience est une série dans le temps prise à 10min d'intervalle dans différentes régions de la cellule et sur différentes couches dans le plan Z entraînant une perte de l'intensité de la fluorescence par photoblanchiment d'une image à la suivante. Pour s'assurer que les images soient comparables dans cet intervalle de temps, le photoblanchiment des cellules est corrigé en post-acquisition via l'utilisation de Fiji ⁸⁸.

Comme mentionné précédemment, les images sont prises en pile pour que nous puissions avoir une vue claire de l'intérieur de la cellule. Ceci implique qu'une partie des images de cette pile sont en dehors du champ de focus du noyau. Nous avons donc sélectionné les images prises dans les plans situés dans le plan transversal du noyau disposées sur une hauteur de 3 microns sur l'axe des Z en excluant le sommet de ce dernier (fig. 16). Ce mode d'acquisition nous a permis de générer les images présentées (fig.17-19) lors des expériences d'inhibition Pol-II dont la portée biologique sera discutée plus bas dans ce chapitre.

5.2.2. Analyse des sous-populations de TPR selon une méthode de suivi de molécule unique

5.2.2.1. Méthode d'analyse et caractéristiques des trajectoires

La population de TPR nucléoplasmique présente différents profils de diffusion définissant plusieurs sous-populations. Nous les avons classifiées en établissant un protocole d'analyse qui fournit des informations sur leur type de mouvement, leur coefficient de diffusion, leur confinement ainsi que le pourcentage qu'elles représentent sur l'ensemble des particules analysées. Pour cela, le protocole d'analyse de l'équipe de Lerner et al, qui a été mis en place pour étudier des protéines liées à la chromatine comme H2B, nous a servi de base. Nous avons optimisé ce dernier en plusieurs étapes pour assurer que notre approche permet une analyse non biaisée de notre protéine d'intérêt, TPR. En effet, le protocole d'analyse de la protéine H2B met l'accent sur les trajectoires confinées, qui représentent la majeure partie des trajectoires. Les données des autres trajectoires ne sont pas prises en compte. Cependant, les molécules de TPR sont sous-divisées en plusieurs types de trajectoires dont une partie en diffusion rapide. Par conséquent, nous avons optimisé le protocole en générant les données de chaque type de trajectoires.

Notre protocole de référence a été présenté dans le cadre d'une analyse de protéines liées à la chromatine, notamment H2B. Cependant, les paramètres et codes utilisés peuvent être adaptés pour une analyse d'une protéine dont le profil de diffusion n'est pas encore établi. Ceci nécessite l'appui de données de différentes études sur la diffusion de protéines pour une comparaison de leurs caractéristiques mais également une identification à l'aide d'approches de protéomiques pour déterminer la nature de leur diffusion. Lorsque des données des trajectoires sont analysées sur MATHLAB, nous utilisons d'abord le code « SMT_Motion_classifier », qui permet de sélectionner les trajectoires selon le nombre d'images (entre 15-25 séries de 10000 images), selon leur T-MSD et leur composant alpha qui sont les paramètres déterminant le type de mouvement et le confinement des particules analysées ⁷⁵.

De façon succincte, la méthode utilisant « SMT_Motion_classifier » permet d'utiliser ces 3 paramètres pour obtenir une classification des trajectoires selon leur valeur alpha. Ainsi, 5 types

de trajectoires peuvent être obtenues selon leur niveau de confinement, leur mouvement et leur diffusion ^{82, 89}.

5.2.2.2. Classification des trajectoires selon leur mouvement

Pour la classification des trajectoires, notre méthode d'analyse considère une limite $\alpha \leq 0.7$ pour un mouvement confiné ; $0.7 < \alpha < 1$ pour un Brownien; $\alpha \geq 1$ pour un mouvement dirigé (fig.26). Ce chevauchement sur la valeur alpha pourrait affecter la caractérisation des trajectoires *restreintes*, *browniennes* et *dirigées*. En effet, le mouvement brownien est généralement défini par une valeur $\alpha=1$, indiquant une diffusion libre, le mouvement confiné par $\alpha < 1$ et le mouvement dirigé/facilité par $\alpha > 1$ ⁷⁵. Vu que les intervalles définissant ces mouvements sont moins restreints, il serait possible qu'un faible pourcentage de ces trajectoires soit attribué à la mauvaise population. Bien que ces valeurs soient théoriques, il serait intéressant de faire une analyse en considérant ces derniers pour déterminer si la caractérisation des trajectoires est affectée ⁷⁵.

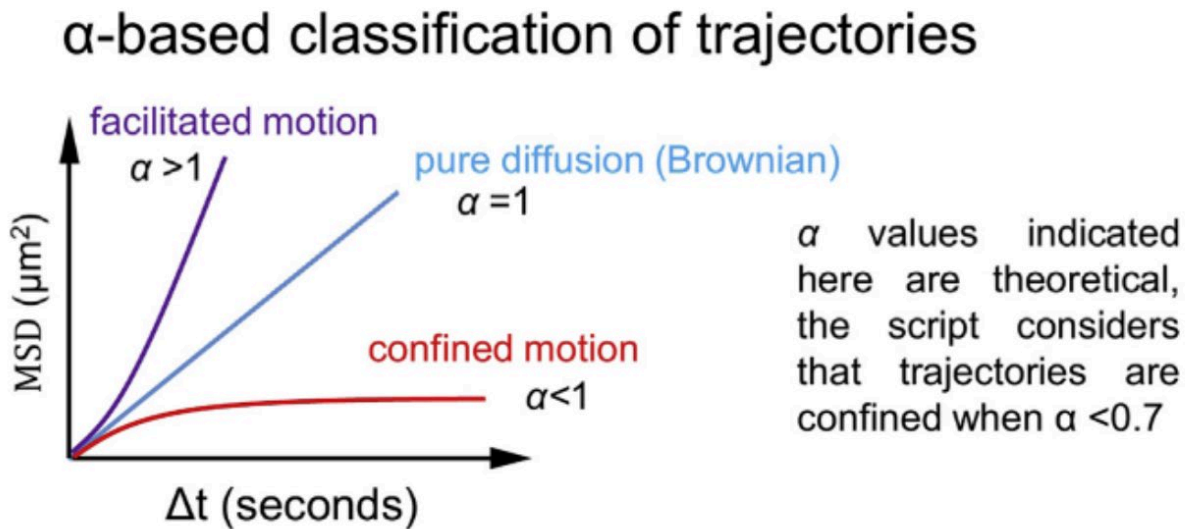


Figure 26.- Classification des trajectoires selon la valeur alpha. La courbe αT -MSD de la composante d'échelle est utilisée pour conserver des trajectoires confinées, correspondant aux molécules associées à la chromatine ; et rejeter les trajectoires de diffusion facilitées et pures, correspondant aux molécules non associées à la chromatine ⁷⁵.

Nous avons d'abord identifié des trajectoires dites *Dirigées*, avec un mouvement facilité des particules ainsi qu'une valeur $\alpha \geq 1$ ⁷⁵. Ces dernières sont majoritairement courtes de taille ($n < 10$ points), dans le cas de la population nucléoplasmique de TPR. Lorsque la détection se fait avec des trajectoires obtenues avec $ET=20ms$, nous remarquons une baisse des trajectoires dirigées, indiquant qu'une partie de celles-ci sont en diffusion rapide. Par conséquent, ces trajectoires ne sont pas identifiées avec des temps d'exposition longs. En revanche, l'analyse pour $ET=10ms$ montre la présence de deux populations, dont une en diffusion lente.

Ainsi, les trajectoires dites dirigées, selon notre méthode d'analyse, représentent une fraction de la sous-population nucléoplasmique de TPR en diffusion rapide dans le noyau. Leur localisation s'étend dans l'ensemble du nucléoplasme et la présence de deux profils de diffusion pourrait suggérer que ces dernières seraient impliquées dans différentes fonctions dans le noyau. Il serait intéressant pour une caractérisation plus poussée, de séparer ces deux fractions observées en faisant une analyse avec des temps d'expositions de 5, 10, 15, 20 et 25ms pour isoler la fraction rapide et la fraction lente. Ceci permettrait également d'avoir une meilleure visualisation de leur distribution dans le noyau.

Ensuite, nous observons des trajectoires dites *Browniennes*, qui représentent les particules en diffusion libre dans le noyau. Ce type de trajectoire est défini par un nombre de points compris entre 5 et 30 et elles sont principalement en diffusion intermédiaire ($Df(Br)=1.2 \mu m^2/s$). Cependant, il existe une fraction en diffusion rapide. Cette fraction rapide moins représentée pourrait être présente à cause de la valeur alpha choisie pour définir le mouvement brownien. Néanmoins nous constatons que celle-ci reste constante à travers différentes conditions d'analyse suggérant que ces trajectoires sont en diffusion libre dans le noyau.

De plus, le pourcentage des trajectoires browniennes et le nombre minimum de points par trajectoires restent similaires pour des temps d'expositions variant de 10 à 20ms. Par conséquent, nous suggérons que cette fraction correspond à la proportion des particules de TPR en diffusion libre dans le nucléoplasme. La constance dans leur distribution suggère qu'elles sont présentes en relativement grand nombre par rapport aux autres types de trajectoires observées.

Nous avons également défini des trajectoires dites confinées et restreintes caractérisées par un niveau de confinement et du déplacement de la molécule unique. Les trajectoires confinées

représentent une faible portion de l'ensemble des trajectoires analysées et ont un déplacement inférieur à 100nm. Contrairement à aux molécules de TPR lié au NPC, leur temps de résidence est faible avec un nombre de points par trajectoires entre 5 et 10 points. Vu qu'il s'agit d'une population en mouvement lent, elles ne sont pas affectées par le temps d'exposition et restent en proportion constantes. Pour une caractérisation poussée de ce type de trajectoire, il est possible d'utiliser le ligand PA-JF549 à une concentration plus élevée, entre 250nM et 500nM, et de mener une acquisition avec un temps d'exposition entre 20ms et 50ms pour 10000 images par série. Ceci permettrait d'optimiser l'analyse pour les trajectoires confinées.

Les trajectoires restreintes ont un déplacement supérieur à 100nm et sont moins abondantes comparées aux trajectoires dirigées et browniennes, cependant, elles possèdent un nombre de points définissant la trajectoire plus élevée, entre 5 à 20 points. En effet, ces dernières sont présentes en deux sous-populations, dont la principale possède un coefficient de diffusion de $D_f(Rt-Slow) = 0.25-1.22 \mu m^2/s$. La fraction la plus rapide se démarque par son coefficient de diffusion correspondant à un mouvement intermédiaire à rapide et de leur longueur qui est similaire à celle des trajectoires dirigées. Sachant que le protocole que nous utilisons n'est pas optimisé pour l'analyse de plusieurs populations avec différents types de mouvements et paramètres, il est possible que cette fraction en diffusion rapide des trajectoires restreintes correspondrait à la marge d'erreur de classification des trajectoires.

Cependant, pour un temps d'exposition de 20ms, cette fraction semble être perdue par rapport à l'analyse 10ms. Ceci peut être dû notamment au biais de l'acquisition vers les trajectoires en diffusion moins rapide, ce qui privilégie les trajectoires avec un plus grand nombre de points. Afin de remédier à ce problème, nous pourrions faire une analyse des trajectoires restreintes uniquement, en limitant la longueur des trajectoires entre 5 à 10 points. Ceci permettrait de mettre en évidence les trajectoires ayant une diffusion rapide, et nous pourrions alors les comparer aux trajectoires dirigées précédemment mentionnées. Il est intéressant de noter que bien que la fraction rapide des trajectoires restreintes pourrait être en lien avec les trajectoires dirigées, elles se démarquent de ces dernières par leur niveau de confinement plus élevé. Celles-ci sont maintenues dans un environnement restreint dans le noyau et possèdent un saut inférieur en moyenne à celles des trajectoires dirigées.

Nous avons finalement identifié des trajectoires dites Butterfly, qui possèdent deux types de mouvement, soit une partie en mouvement confiné et au moins 30% en mouvement dirigé/brownien.⁷⁵ Lorsque nous faisons une analyse en incluant la périphérie nucléaire, un enrichissement des trajectoires Butterfly est observé, cependant, ceci pourrait être dû à la présence des molécules de TPR au niveau du NPC. Par conséquent, nous n'avons pas considéré ces trajectoires pour la caractérisation des sous-populations nucléoplasmique de TPR en raison de leur faible présence et des risques d'erreur. Ainsi, en prenant en compte nos résultats et les différentes caractéristiques des types de trajectoires de TPR nucléoplasmique, nous suggérons le modèle illustre dans la figure 27.

Modèle de diffusion de TPR nucléoplasmique selon niveau de confinement

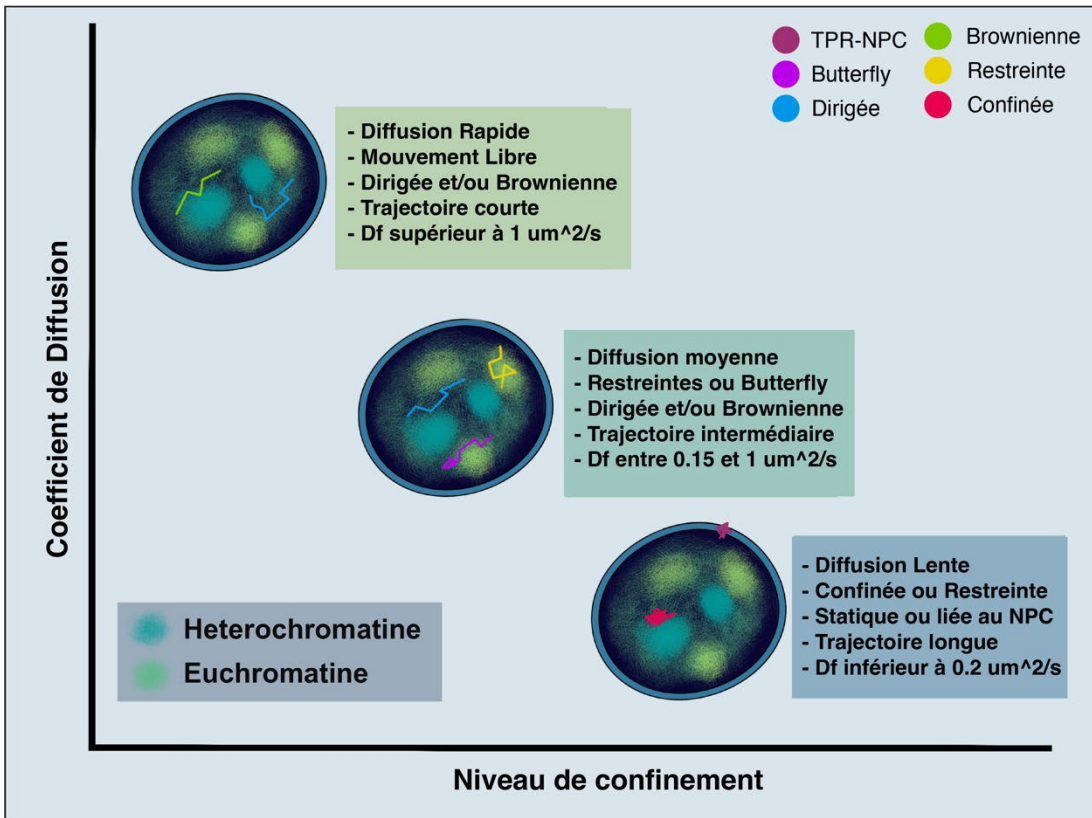
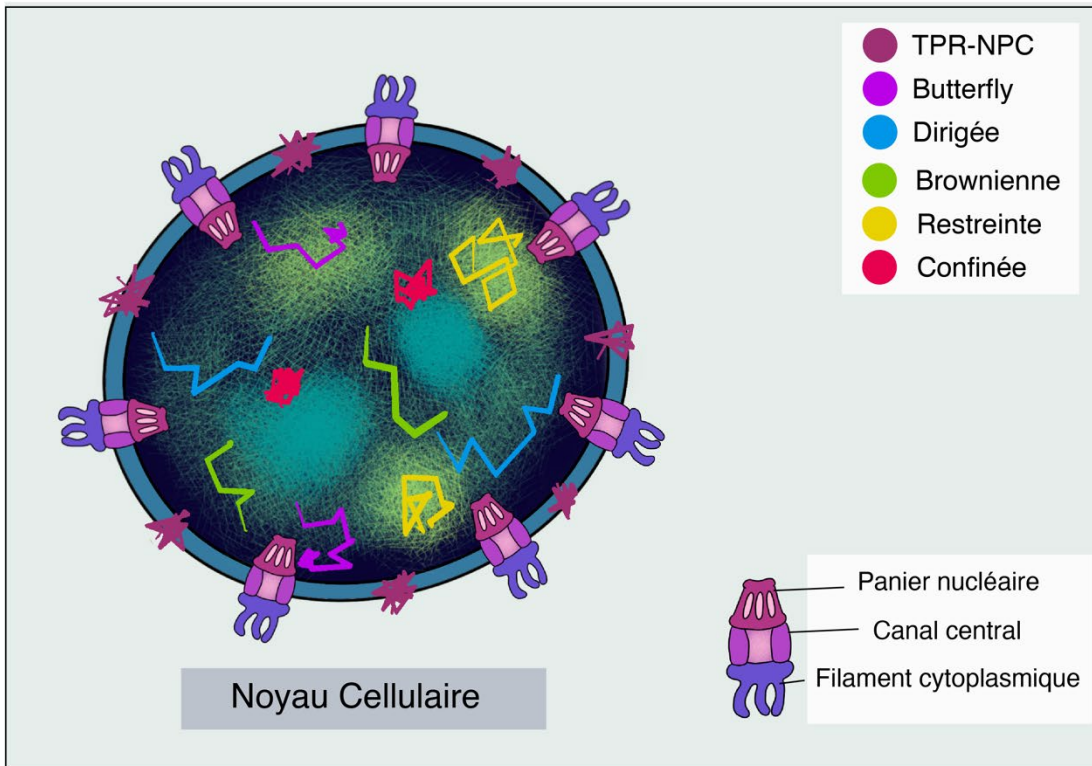


Figure 27. – Modèle de la dynamique de TPR dans le noyau. Les différents types de mouvements identifiés dans ce mémoire sont indiqués dans la légende en haut à droite.

(A) La représentation du noyau contient les pores nucléaires et les paniers (mauve), ainsi que différents compartiments du noyau, euchromatine et hétérochromatine (bleu-vert). (B) Modélisation des types de trajectoires selon le coefficient de diffusion et le niveau de confinement mesurés dans cette étude.

5.3. Les fonctions de la fraction nucléoplasmique de TPR

5.3.1. La distribution de TPR dans le nucléoplasme suggère une fonction distincte de celle des molécules de TPR associées au NPC

La protéine TPR du panier a auparavant été décrite comme impliquée dans le contrôle qualité dans le noyau pour l'export des ARNm. Cependant, ce rôle est encore peu caractérisé. De façon intéressante il a été montré récemment qu'il existe une population de cette protéine qui se localise dans le nucléoplasme ⁹⁰. Nous observons que cette sous-population de TPR en diffusion dans le noyau ne semble pas être en interaction dynamique avec le NPC. En effet, lorsque nous avons réalisé une expérience FRAP sur des cellules dont TPR est marquée avec GFP, nous n'observons pas une récupération de la fluorescence pendant les 30 premières minutes. Au-delà de 40min, seulement 30% de la fluorescence est récupérée, ce qui suggère que la fraction de TPR lié au NPC est en interaction stable avec le pore. Cette observation montre un taux d'échange relativement faible de la protéine TPR au pore notamment en comparaison d'autres protéines associées au panier nucléaire comme Nup50 et Nup153 pour lesquelles la restitution du signal mesurée par frappe est de l'ordre de secondes ²⁰.

Nous postulons donc que la fraction de TPR nucléoplasmique est disponible pour permettre un remplacement des molécules associées au pore et que le faible taux d'échanges pourrait également suggérer que la fraction nucléoplasmique possède une autre fonction à l'intérieur du noyau. Par conséquent, la question suivante se pose : quelles sont les fonctions de la sous-population nucléoplasmique de TPR dans le noyau? Pour y répondre, nous avons mené une étude cherchant à caractériser la dynamique de TPR nucléoplasmique pour en déterminer les fonctions et potentielles associations.

5.3.2. L'inhibition de la transcription via Pol-II induit la formation de granules de TPR

Une partie des molécules de TPR est présente au niveau de la périphérie nucléaire en association avec le NPC. Cependant, une proportion notable de ces dernières est dans le noyau en diffusion. Lorsque nous observons les cellules TPR-Halo marquées avec le ligand JF549 en microscopie sur cellules vivantes, nous pouvons observer que les noyaux marqués présentent deux phénotypes : environ 70-80% ont un marquage distinct à la périphérie nucléaire, et entre 20-30% présentent en plus une granule contenant TPR-Halo. Ces granules sont généralement en faible nombre, en moyenne 1 à 3 (Tab.2). Ces deux phénotypes sont observés dans les différentes lignées de cellules utilisées dans cette étude, incluant la lignée TPR-GFP. La formation de granules similaires a déjà été rapportée lors de l'observation d'autres nucléoporines, notamment Nup153, Nup98 et Nup50^{28 27}.

La distribution de chacune de ces nucléoporines peut être liée à leurs dynamiques dans le noyau, leurs fonctions et leurs interactomes. En effet, il a été montré dans ces cellules de mammifères que Nup50 est présent en association avec le NPC et dans le nucléoplasme. Cette protéine présente une dynamique dépendante de la transcription pour ses deux populations dans le noyau, suggérant que sa fraction nucléoplasmique interagit avec l'euchromatine²⁰. Effectivement, lorsque la transcription est inhibée dans des cellules myoblastes C2C12 de souris, Nup50 est immobilisée dans le nucléoplasme de manière homogène²⁰. Ceci s'applique lorsque les cellules sont traitées avec les inhibiteurs de la transcription tels que Actinomycine D et DRAQ5. Ces drogues sont des intercalants d'ADN et affectent la transcription immobilisant l'élongation de Pol-II, la distribution des histones et de certains facteurs de transcription entre autres⁹¹. Cependant, l'effet de ces inhibiteurs sur Pol-II n'est pas aussi important comparativement aux histones. Ainsi, il a été suggéré que Nup50 ne serait pas en interaction directe avec la Pol-II mais plutôt avec un composant abondant de l'euchromatine telles que les histones ou les protéines liées aux histones²⁰.

Nup98, une nucléoporine du complexe Y dynamique, présente également une association dynamique dans le nucléoplasme, dans des compartiments nucléaires, dits les corps GLFG (Glycine–Leucine–Phénylalanine–Glycine) et avec le pore nucléaire. Il est intéressant de noter que l'inhibition de la transcription via Pol-II affecte la mobilité de Nup98 en limitant sa diffusion dans

le nucléoplasme. En effet, Nup98 est en équilibre dans ces deux zones du noyau et son mouvement dynamique entre le nucléoplasme et le pore nucléaire dépend d'une transcription active ⁹². Nup153 cependant, bien qu'impliquée dans le processus de maturation et d'export de l'ARN n'est pas particulièrement affecté par l'inhibition de la transcription via DRB ⁹². Ainsi, les observations décrivant la dynamique des nucléoporines mobiles dans le nucléoplasme et leurs différentes fonctions dans le noyau soulèvent des questions sur le rôle de la fraction libre de TPR et sur l'impact de l'inhibition de la transcription sur sa dynamique.

Comme nous pouvons le constater (fig.17), les cellules TPR-HALO, lorsque traitées avec DRB, présentent des granules de TPR dans le noyau dont la fréquence et la taille augmentent avec la durée du traitement. De plus, la formation de granules induites par le traitement DRB, est plus importante pour les cellules qui en présentent déjà avant l'inhibition de la transcription. Lors de la formation des granules, nous n'avons pas observé de diminution majeure du signal de TPR à la périphérie. Bien qu'une quantification rigoureuse du signal de TPR à la périphérie serait nécessaire après du traitement avec DRB, nos résultats suggèrent qu'il s'agit plutôt de la fraction de TPR nucléoplasmique qui forme les granules lors de l'inhibition de la transcription.

Cependant, il reste à déterminer la composition de ces granules observées et leur rôle dans le noyau afin de caractériser le rôle de TPR dans le nucléoplasme. Sachant que la population nucléoplasmique de cette protéine est affectée par l'inhibition de la transcription, les questions peuvent être posées : est-ce la perte d'activité transcriptionnelle elle-même ou la diminution de la quantité d'ARNm dans le noyau qui induit la formation d'agrégats de TPR dans le noyau? Nous pouvons alors proposer que si TPR interagit avec les complexes de transcription et d'épissage lors de la transcription des ARNm, son inhibition pourrait causer une augmentation du nombre de molécules de TPR libre dans le nucléoplasme. Par conséquent, ces dernières n'étant pas liées à un complexe, formeraient des agrégats en interagissant entre elles. De plus, en considérant que TPR agit tôt dans la transcription des ARNs et serait impliqué dans le processus de maturation, l'inhibition de la Pol-II pourrait causer une accumulation des facteurs de maturation des ARN, tels que les protéines d'épissage, et des RBPs. En absence de transcription polII, il a été suggéré que les facteurs impliqués dans l'épissage soient recrutés dans des compartiments du noyau en réserve pour y être stockés en attente de la reprise de la transcription ⁹³.

Nous supposons que TPR pourrait être recrutée dans ces granules lorsque Pol-II est inhibée. Cette proposition est supportée par nos résultats préliminaires analysant l'interactome de TPR et montrant une interaction de celle-ci avec des composants du complexe d'épissage, ainsi qu'avec d'autres facteurs de la maturation de l'ARN en conditions physiologiques. Pour tester cette hypothèse, il serait possible de regarder la colocalisation de ces facteurs d'épissage afin de déterminer s'ils sont également recrutés avec les granules formées par TPR observées en présence et en absence d'un inhibiteur de la transcription.

Dans la levure (*S. cerevisiae*), l'homologue de TPR, Mlp1/2, joue un rôle important dans le métabolisme ARN et le contrôle qualité de l'export ⁹⁴. En effet, tous les NPCs ne contiennent pas de panier nucléaire dans la levure, et Mlp1 est en association dynamique avec le complexe, contrairement à TPR. Cette protéine est donc présente dans une fraction nucléoplasmique et une en association avec certains NPC. Une étude récente menée au laboratoire du Dr. Zenklusen montre que l'assemblage des paniers nucléaires au niveau des NPC dépend du métabolisme des ARNs ⁹⁴.

Lorsque la transcription médiée par la Pol-II est inhibée, Mlp1 forme des agrégats au niveau de la périphérie nucléaire. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la fraction nucléoplasmique de Mlp1 et ces granules représenteraient les fractions de Mlp1 détachées des pores. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que le métabolisme intranucléaire des ARNs et l'export prévient la formation des granules contenant Mlp1/2 et participe ainsi au maintien de la stabilité des paniers nucléaires ⁹⁴. Par analogie avec les observations faites en levures, nous supposons que les granules de TPR pourraient contenir des protéines de la maturation de mRNP. Par conséquent, TPR pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des ARNs en interagissant avec des mRNPs pour faciliter l'export en amont du pore dans le noyau.

Parmi les protéines obtenues dans l'interactome de TPR (fig.5), nous avons également identifié des facteurs de l'export des ARNs. Une étude récente suggère que TPR serait un composant intégral de la voie d'export des ARNs médiée par le complexe TREX-2 ⁸⁷. Il serait intéressant de déterminer si l'inhibition de la transcription de Pol-II affecte la localisation des composants du complexe TREX-2, notamment dans les granules de TPR. Ceci pourrait être testé en marquant un composant du complexe TREX, tel que GANP, avec une protéine fluorescente. Nous suivrons ensuite les changements observés dans le noyau pour ces deux protéines en cellules vivantes ⁸⁷.

Ainsi, TPR pourrait avoir plusieurs rôles dans le noyau selon sa distribution et localisation, et les effets observés lorsque la transcription est inhibée suggèrent une implication dans la transcription et la maturation des ARNm. Cependant, la sous-population nucléoplasmique de TPR présente des profils de diffusion distincts, suggérant différentes fonctions dans le noyau.

5.4. Caractérisations des types de trajectoires de la population nucléoplasmique de TPR

En utilisant une approche de microscopie en cellule vivante avec un suivi de molécule unique, nous avons déterminé que TPR nucléoplasmique pourrait être divisée en 4 types de trajectoires selon leur paramètre de diffusion. Chacune d'entre elles présente des caractéristiques distinctes qui pourraient correspondre à différentes fonctions dans le noyau ou bien différentes dynamiques de la protéine dans le noyau. Cependant, les coefficients de diffusion obtenues démontrent un potentiel liant dans différents processus cellulaires. Ainsi, l'identification de ces trajectoires et de leur position dans le noyau pourrait permettre une meilleure compréhension des fonctions de TPR dans le nucléoplasme.

5.4.1. La fraction de TPR nucléoplasmique en diffusion libre n'est pas affectée par l'absence de la transcription via Pol-II

Parmi les types de trajectoires observées, nous avons identifié une fraction qui correspondrait aux molécules de TPR en diffusion libre dès le noyau. Il s'agit des trajectoires browniennes, en diffusion dite libre ou pure ⁷⁵. Effectivement, ces dernières possèdent un coefficient de diffusion moyen d'environ $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ qui suggèrent que les molécules de TPR correspondantes ne sont pas en diffusion facilitée, qui représente une diffusion médiée par une protéine intermédiaire, tels que les facteurs d'export nucléaire ⁹⁵.

La proportion rapide des trajectoires restreintes dans la population de TPR nucléoplasmique reste constante dans nos analyses, représentant environ 30% des trajectoires analysées. Lorsque la transcription est inhibée, nous n'observons pas de changement significatif

dans cette fraction, suggérant qu'elles ne dépendent pas de la transcription des ARNm. Ainsi, les trajectoires browniennes correspondraient à la fraction de TPR en diffusion libre dans le nucléoplasme. Elles pourraient servir de réserve pour la mitose ou pour être recrutées dans différents processus si TPR est nécessaire.

En effet, une étude montre que TPR serait un régulateur par rétroaction négative de l'assemblage des NPC lors de la mitose ⁹⁶. La présence de cette nucléoporine permettrait de réguler le nombre de NPC et la densité de ces complexes dans le cellule en cours de cycle cellulaire. Ceci se fait par la phosphorylation de TPR et son association avec ERK, qui permet également la phosphorylation d'autres Nups par ce complexe TPR-ERK, notamment Nup153 ⁹⁶. Ainsi, nous suggérons que la sous-population de TPR libre pourrait servir de réserve pour la mitose afin de réguler la formation du NPC en formant un complexe avec la kinase ERK.

5.4.2. La sous-population nucléoplasmique de TPR interagit avec la chromatine

Les molécules formant la population statique et plus lente ont une trajectoire confinée représentent 9% de la population nucléoplasmique totale. Nous observons grâce à un marquage DAPI/Hoescht que ces dernières tendent à être localisées dans les zones d'euchromatine et/ou à proximité des nucléoles avec une faible densité du signal de DAPI. Ce schéma de localisation a été observée dans la majorité des noyaux analysés, cependant, la faible proportion de ces foci par cellule n'a pas permis de tester de manière statistique le biais de localisation pour ces molécules et devront faire l'objet d'études plus approfondies pour établir de façon robuste leur répartition préférentielle dans les zones à faible densité d'hétérochromatine.

Nous avons pu mesurer que le temps de résidence de ces molécules est faible et leurs trajectoires sont plutôt courtes. De plus nous avons observé qu'avec un temps d'exposition plus long, leur diffusion et leur temps de résidence ne changent pas. Les protéines associées à la chromatine sont généralement stables et ont en temps de résidence long. Cette dernière observation pourrait suggérer que les molécules de TPR en diffusion lente n'auraient qu'une interaction

transitoire avec l'euchromatine. TPR servirait de support pour différents processus proche de la chromatine et des complexes qui lui sont associés lors de la transcription.

Dans ce modèle (fig.28), TPR pourrait être impliquée prématurément dans la transcription d'ARN naissant, ou lors des dernières étapes de la transcription lors desquels elle deviendrait statique pour de brefs intervalles de temps. Cette hypothèse pourrait être testée par des expériences de CHIP utilisant comme appât la fraction de TPR nucléoplasmique spécifiquement. Les molécules de TPR nucléoplasmique peuvent être obtenues en réalisant une double purification par affinité en utilisant une nucléoporine stablement liée au NPC comme appât pour la fraction de TPR liée aux pores. Selon ce modèle la proximité possible de TPR et des molécules en diffusion lente, les sites de transcription devraient également être perdus lors de l'inhibition de la transcription pol II.

5.4.3. La sous-population nucléoplasmique de TPR pourrait être impliquée dans le processus de maturation des ARN

5.4.3.1. La diffusion de TPR suggère une localisation dans les NS

Nous avons observé des trajectoires restreintes de TPR nucléoplasmique qui sont principalement en diffusion lente. Celles-ci sont divisées en deux groupes, une en diffusion lente et une en diffusion intermédiaire. Elles se démarquent des trajectoires confinées par leur déplacement qui est plus large et leur rayon de confinement plus large.

Le coefficient de diffusion de la fraction principale étant entre $D_f(Rt-Slow) = 0.25-1.22 \mu\text{m}^2/\text{s}$ suggère qu'une grande partie de ces molécules pourraient être en association avec des mRNPs. En effet, la diffusion des ARNm dans le noyau présente un coefficient entre $0.3 - 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ selon le système étudié, le type de transcrit et le type cellulaire. Nous suggérons que les trajectoires restreintes pourraient correspondre alors à une fraction de TPR nucléoplasmique en association avec mRNPs. Dans ce modèle, TPR fait partie de l'assemblage constituant la mRNP et pourraient donc jouer un rôle dans le processus de maturation des ARNm jusqu'à l'étape de l'export ^{87 64}.

Les trajectoires restreintes sont distribuées dans le noyau principalement dans les zones d'euchromatines. De plus, elles sont dites restreintes car bien qu'elles présentent un déplacement et un rayon de confinement plus large que les particules confinées, elles sembleraient être limitées

dans un compartiment du noyau. De plus, l'analyse des films obtenus par microscopie de suivi de molécules uniques suggèrerait que certaines molécules sont recrutées dans ces zones limitées du noyau, qui pourraient correspondre aux NS.

Par conséquent, quelle serait la fonction des trajectoires restreintes dans le nucléoplasme. Les travaux du laboratoire de Palazzo suggèrent que TPR jouerait un rôle dans l'export des ARNm en agissant en aval du recrutement du facteur d'export NFX1⁶⁴. En effet, leurs observations suggèrent que TPR pourrait exercer une influence sur le transit des certains ARNm dans les NS. En effet, la déplétion de TPR induit une accumulation de ces transcrits dans ces NS. Également, comme mentionné précédemment, TPR interagit avec le complexe TREX-2 pour l'export des ARNm. Cette protéine du panier nucléaire servirait donc de facilitateur du transit d'ARNm et de leur arrimage au niveau de NPC avant leur export. TPR pourrait donc être en association avec les ARNm avant que ces dernières atteignent le NPC pour assurer un export. Par conséquent, en prenant en compte ces observations, les trajectoires restreintes pourraient correspondre aux molécules de TPR liée aux ARNm mais également dans les NS^{87 64}.

Lorsque la transcription via Pol-II est inhibée, nous observons un enrichissement de ces trajectoires restreintes dans le noyau. Cependant, ceci s'accompagne d'une baisse de leur coefficient de diffusion moyen. En supposant que ces dernières correspondent à la fraction de TPR nucléoplasmique en association avec les mRNP et dans les NS, la baisse de leur diffusion s'expliquerait par leur recrutement dans les NS. En effet, lorsque la transcription est inhibée, les facteurs de maturation sont recrutés dans ces compartiments dans le noyau. Si TPR est effectivement impliquée dans ce processus, elle sera également recrutée dans le NS en absence de production d'ARN. Par conséquent, il y aura une baisse des molécules de TPR en association avec les mRNPs prêtes à être exportées puisque ces dernières sont localisées dans les NS⁶⁴.

5.4.3.2. La distribution de TPR suggère un rôle dans le processus d'export des ARN

Les trajectoires dirigées sont celles dont le coefficient de diffusion est élevé, soit $D_f(D_r) = 4.1 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 4.65$, et représentent également la population la plus abondante des trajectoires. Celles-ci sont divisées en deux groupes selon leur coefficient de diffusion et nous pouvons observer une

fraction en diffusion très rapide et une en diffusion rapide à intermédiaire. En postulant que les trajectoires browniennes sont celles correspondant à la fraction en diffusion libre, à quoi correspondraient les trajectoires dirigées?

Ces deux types de diffusion sont représentés dans la fraction des trajectoires dans des proportions similaires. Pour la fraction la plus rapide, ces dernières sont abondantes avec des coefficients de diffusion allant jusqu'à $20 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ceci représente une caractéristique de protéine en diffusion facilitée, ce qui suggère qu'il s'agirait de molécules de TPR dans le nucléoplasme en association avec des protéines nucléaires tels que les facteurs de transcription, qui présentent des coefficients de diffusion de cette nature ⁹⁷.

Dans le cas de la fraction en diffusion intermédiaire à rapide, celles-ci pourraient également correspondre aux molécules liées avec des complexes protéiques macromoléculaires. De plus, une partie de ces trajectoires restreintes pourraient être en association avec les mRNPs. En effet, lorsque la transcription via Pol-II est inhibée, les trajectoires dirigées sont celles les plus affectées. En effet, nous observons une baisse du coefficient de diffusion mais également du pourcentage de leur population, plus particulièrement celle en diffusion rapide. L'enrichissement des trajectoires restreintes suggère que l'inhibition de la transcription affecte les trajectoires dirigées. Ceci pourrait être dû au recrutement de ces molécules dans les NS, ce qui expliquerait la baisse de cette population. Ainsi, les NS pourraient être le compartiment où TPR serait recruté. Pour pouvoir déterminer si TPR est effectivement localisé dans les NS, nous pouvons utiliser une protéine résidente de ce compartiment pour une étude microscopique comme SON ou SRRM2. La protéine d'intérêt serait donc marquée avec une protéine fluorescente et observée dans une lignée cellulaire TPR-HALO pour déterminer une colocalisation de ces dernières. Une immunofluorescence peut également être utilisée pour la localisation.

Ainsi, à partir de nos observations et caractéristiques des sous-populations nucléoplasmiques de TPR, nous proposons le modèle final de sa distribution dans le noyau et de ses potentielles fonctions (fig.28). Ceci permet d'illustrer la complexité de cette protéine qui semble être impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Il reste encore à déterminer si cette diversité de caractéristiques de diffusion corrèle avec une fonction directe dans le métabolisme d'ARNm.

Modèle de la localisation de TPR nucléoplasmique de la transcription à l'export

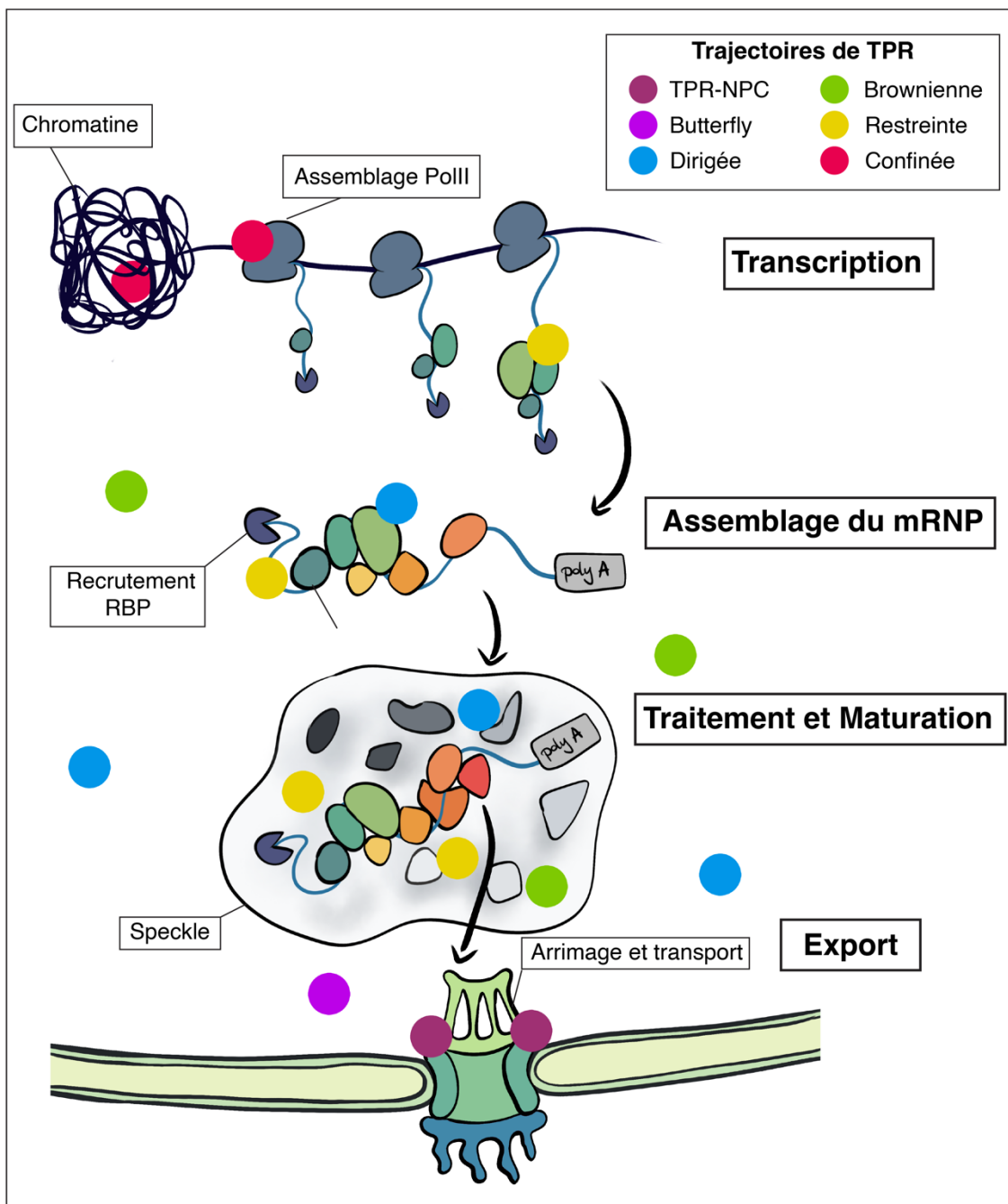


Figure 28. – Modèle d'interaction de TPR nucléoplasmique à différentes étapes du métabolisme des ARNm.

Les différents types de trajectoires de TPR nucléoplasmique identifiées sont illustrées dans les étapes de la transcription, de la maturation et d'export où elles seraient retrouvées. Ce modèle est basé sur la diffusion, le confinement et la distribution dans le noyau.

6. Conclusion et perspectives

En définitive, notre étude de la population nucléoplasmique de TPR nous permet d'identifier différentes sous-populations ainsi que les caractéristiques qui la définissent. Nous avons pu montrer que, non seulement, TPR est présent dans une fraction nucléoplasmique en diffusion, mais également, que cette fraction peut être subdivisée en plusieurs sous-populations selon plusieurs paramètres.

Notre approche d'analyse de molécule unique nous a permis de caractériser différents profils de diffusion des sous-populations de TPR nucléoplasmiques. Nous observons que les trajectoires dirigées, dont la diffusion est rapide ou facilitée, ne semblent pas restreintes dans un compartiment du noyau et sont divisées en deux groupes. Elles comportent les particules ayant une diffusion facilitée sont très rapides représentant 40% d'entre elles; ainsi que les particules avec des trajectoires dirigées en une diffusion intermédiaire (tab.1). Ces dernières sont enrichies lorsque la transcription médiée par Pol-II est inhibée, possiblement en affectant la fraction en diffusion facilitée d'entre elles. Il reste encore à déterminer leur interaction dans le nucléoplasme ainsi que leurs fonctions potentielles.

Nous observons des trajectoires browniennes, qui sont les deuxièmes en termes de pourcentage. Elles correspondraient aux molécules de TPR en diffusion libre dans le nucléoplasme. Ces dernières ne semblent pas être affectées par l'inhibition de la transcription. De plus nous observons des trajectoires restreintes qui sont présentes en deux fractions, une en diffusion lente et une diffusion intermédiaire. Leur pourcentage est augmenté à la suite d'un traitement avec DRB et leur coefficient de diffusion baisse. Elles pourraient être impliquées dans le métabolisme des pré-ARNs ou dans l'épissage des ARN, car leur coefficient de diffusion corrèlerait avec la diffusion des pré-mRNP.

Et enfin, nous avons les trajectoires confinées et *Butterfly*, qui sont présentes à moins de 10%. Leur caractérisation reste encore incomplète en raison de leur faible abondance. Les trajectoires confinées présentent des caractéristiques établies dans des études précédentes correspondant à

celle des particules interagissant avec la chromatine.⁷⁵ Une interaction des particules TPR avec chromatine pourrait être confirmée à l'aide de marqueur de l'ADN génomique.

En conclusion, nous proposons que la population nucléoplasmique de TPR présente des sous-populations hétérogènes en termes de dynamique et distribution dans le noyau. Une étude de leurs interactomes respectifs permettrait de mieux comprendre leurs rôles dans la voie d'expression et d'export des ARNm. Il serait notamment intéressant de tester le modèle selon lequel TPR interagit avec les pré-mRNPs dans le nucléoplasme. Pour cela, une étude de l'interactome de TPR utilisant des approches de purification par affinités de la fraction libre de TPR spécifiquement permettrait de connaître l'interactome de cette protéine à l'intérieur du noyau. Pour cela nous pourrions réaliser une double purification par affinité, qui comprend deux étapes de purification, isolant le NPC entier pour TPR lié au pore, suivi d'une autre avec le surnageant pour obtenir la population de TPR dans le nucléoplasme. En complément de l'étude du mouvement des molécules de TPR dans le noyau, la purification par affinité isolant la fraction nucléaire de TPR et son interactome pourrait fournir les premières données et mettre en évidence la fonction de TPR en plus de la formation du panier nucléaire à la périphérie du noyau.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Beck, M., and Hurt, E. (2017) The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight, *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 73-89.
- [2] Lin, D. H., and Hoelz, A. (2019) The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update), *Annu Rev Biochem* 88, 725-783.
- [3] Doye, V., and Hurt, E. (1997) From nucleoporins to nuclear pore complexes, *Curr Opin Cell Biol* 9, 401-411.
- [4] Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism, *J Cell Biol* 148, 635-651.
- [5] Schwartz, T. U. (2016) The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex, *J Mol Biol* 428, 1986-2000.
- [6] Grunwald, D., Singer, R. H., and Rout, M. (2011) Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes, *Nature* 475, 333-341.
- [7] de Las Heras, J. I., Batrakou, D. G., and Schirmer, E. C. (2013) Cancer biology and the nuclear envelope: a convoluted relationship, *Semin Cancer Biol* 23, 125-137.
- [8] Hampoelz, B., Andres-Pons, A., Kastritis, P., and Beck, M. (2019) Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex, *Annu Rev Biophys* 48, 515-536.
- [9] Goldberg, M. W., and Allen, T. D. (1992) High resolution scanning electron microscopy of the nuclear envelope: demonstration of a new, regular, fibrous lattice attached to the baskets of the nucleoplasmic face of the nuclear pores, *J Cell Biol* 119, 1429-1440.
- [10] Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Daneholt, B., and Allen, T. D. (1996) RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket, *J Mol Biol* 260, 304-311.
- [11] Buchwalter, A., Kaneshiro, J. M., and Hetzer, M. W. (2019) Coaching from the sidelines: the nuclear periphery in genome regulation, *Nat Rev Genet* 20, 39-50.
- [12] Capelson, M., and Hetzer, M. W. (2009) The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease, *EMBO Rep* 10, 697-705.
- [13] Krull, S., Dorries, J., Boysen, B., Reidenbach, S., Magnusius, L., Norder, H., Thyberg, J., and Cordes, V. C. (2010) Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion, *EMBO J* 29, 1659-1673.

- [14] Pascual-Garcia, P., and Capelson, M. (2019) Nuclear pores in genome architecture and enhancer function, *Curr Opin Cell Biol* 58, 126-133.
- [15] Pascual-Garcia, P., Debo, B., Aleman, J. R., Talamas, J. A., Lan, Y., Nguyen, N. H., Won, K. J., and Capelson, M. (2017) Metazoan Nuclear Pores Provide a Scaffold for Poised Genes and Mediate Induced Enhancer-Promoter Contacts, *Mol Cell* 66, 63-76 e66.
- [16] Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., and Steitz, J. A. (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export, *Mol Cell* 11, 837-843.
- [17] Blobel, G. (1985) Gene gating: a hypothesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8527-8529.
- [18] Aksenova, V., Lee, H. N., Smith, A., Chen, S., Bhat, P., Iben, J., Echeverria, C., Fontoura, B., Arnautov, A., and Dasso, M. (2019) Distinct Basket Nucleoporins roles in Nuclear Pore Function and Gene Expression: Tpr is an integral component of the TREX-2 mRNA export pathway, *bioRxiv*, 685263.
- [19] Pascual-Garcia, P., and Capelson, M. (2014) Nuclear pores as versatile platforms for gene regulation, *Curr Opin Genet Dev* 25, 110-117.
- [20] Buchwalter, A. L., Liang, Y., and Hetzer, M. W. (2014) Nup50 is required for cell differentiation and exhibits transcription-dependent dynamics, *Mol Biol Cell* 25, 2472-2484.
- [21] Capelson, M., Liang, Y., Schulte, R., Mair, W., Wagner, U., and Hetzer, M. W. (2010) Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes, *Cell* 140, 372-383.
- [22] Liang, Y., Franks, T. M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., and Hetzer, M. W. (2013) Dynamic association of NUP98 with the human genome, *PLoS Genet* 9, e1003308.
- [23] Kalverda, B., Pickersgill, H., Shloma, V. V., and Fornerod, M. (2010) Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm, *Cell* 140, 360-371.
- [24] Khan, A. U., Qu, R., Ouyang, J., and Dai, J. (2020) Role of Nucleoporins and Transport Receptors in Cell Differentiation, *Front Physiol* 11, 239.
- [25] Enninga, J., Levay, A., and Fontoura, B. M. (2003) Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex, *Mol Cell Biol* 23, 7271-7284.

- [26] Gallardo, P., Salas-Pino, S., and Daga, R. R. (2017) A new role for the nuclear basket network, *Microb Cell* 4, 423-425.
- [27] Makise, M., Mackay, D. R., Elgort, S., Shankaran, S. S., Adam, S. A., and Ullman, K. S. (2012) The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import, *J Biol Chem* 287, 38515-38522.
- [28] Hase, M. E., and Cordes, V. C. (2003) Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex, *Mol Biol Cell* 14, 1923-1940.
- [29] Guan, T., Kehlenbach, R. H., Schirmer, E. C., Kehlenbach, A., Fan, F., Clurman, B. E., Arnheim, N., and Gerace, L. (2000) Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export, *Mol Cell Biol* 20, 5619-5630.
- [30] Singh, G., Pratt, G., Yeo, G. W., and Moore, M. J. (2015) The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion, *Annual Review of Biochemistry* 84, 325-354.
- [31] Soop, T., Ivarsson, B., Bjorkroth, B., Fomproix, N., Masich, S., Cordes, V. C., and Daneholt, B. (2005) Nup153 affects entry of messenger and ribosomal ribonucleoproteins into the nuclear basket during export, *Mol Biol Cell* 16, 5610-5620.
- [32] Daneholt, B. (2001) Assembly and transport of a pre-messenger RNP particle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7012-7017.
- [33] Soop, T., Nashchekin, D., Zhao, J., Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A. T., Bjorkroth, B., Ovchinnikov, L., and Daneholt, B. (2003) A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription, *J Cell Sci* 116, 1493-1503.
- [34] Eberle, A. B., and Visa, N. (2014) Quality control of mRNP biogenesis: networking at the transcription site, *Semin Cell Dev Biol* 32, 37-46.
- [35] Müller-McNicoll, M., and Neugebauer, K. M. (2013) How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes, *Nature Reviews Genetics* 14, 275.
- [36] Oeffinger, M., and Zenklusen, D. (2012) To the pore and through the pore: a story of mRNA export kinetics, *Biochim Biophys Acta* 1819, 494-506.
- [37] Tutucci, E., and Stutz, F. (2011) Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 377-384.
- [38] Wickramasinghe, V. O., and Laskey, R. A. (2015) Control of mammalian gene expression by selective mRNA export, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 431.

- [39] Coyle, J. H., Bor, Y. C., Rekosh, D., and Hammarskjold, M. L. (2011) The Tpr protein regulates export of mRNAs with retained introns that traffic through the Nxf1 pathway, *RNA* 17, 1344-1356.
- [40] Rajanala, K., and Nandicoori, V. K. (2012) Localization of nucleoporin Tpr to the nuclear pore complex is essential for Tpr mediated regulation of the export of unspliced RNA, *PLoS One* 7, e29921.
- [41] Bonnet, A., and Palancade, B. (2014) Regulation of mRNA trafficking by nuclear pore complexes, *Genes (Basel)* 5, 767-791.
- [42] Green, D. M., Johnson, C. P., Hagan, H., and Corbett, A. H. (2003) The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1010-1015.
- [43] Hackmann, A., Wu, H., Schneider, U. M., Meyer, K., Jung, K., and Krebber, H. (2014) Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1, *Nat Commun* 5, 3123.
- [44] Soheilypour, M., and Mofrad, M. R. (2016) Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs, *Sci Rep* 6, 35380.
- [45] Reichert, V. L., Le Hir, H., Jurica, M. S., and Moore, M. J. (2002) 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly, *Genes Dev* 16, 2778-2791.
- [46] Huang, Y., Yario, T. A., and Steitz, J. A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9666-9670.
- [47] Teplova, M., Wohlbold, L., Khin, N. W., Izaurrealde, E., and Patel, D. J. (2011) Structure-function studies of nucleocytoplasmic transport of retroviral genomic RNA by mRNA export factor TAP, *Nat Struct Mol Biol* 18, 990-998.
- [48] Azimi, M., Bulat, E., Weis, K., and Mofrad, M. R. (2014) An agent-based model for mRNA export through the nuclear pore complex, *Mol Biol Cell* 25, 3643-3653.
- [49] Siebrasse, J. P., Kaminski, T., and Kubitscheck, U. (2012) Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9426-9431.

- [50] Grunwald, D., and Singer, R. H. (2010) In vivo imaging of labelled endogenous beta-actin mRNA during nucleocytoplasmic transport, *Nature* 467, 604-607.
- [51] Neugebauer, K. M. (2019) Nascent RNA and the Coordination of Splicing with Transcription, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11.
- [52] Merz, C., Urlaub, H., Will, C. L., and Luhrmann, R. (2007) Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment, *RNA* 13, 116-128.
- [53] Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J. D., Shaffer, S. A., Weng, Z., and Moore, M. J. (2012) The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus, *Cell* 151, 750-764.
- [54] McCloskey, A., Taniguchi, I., Shinmyozu, K., and Ohno, M. (2012) hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export, *Science* 335, 1643-1646.
- [55] Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export, *Nature* 417, 304-308.
- [56] Wickramasinghe, V. O., McMurtrie, P. I., Mills, A. D., Takei, Y., Penrhyn-Lowe, S., Amagase, Y., Main, S., Marr, J., Stewart, M., and Laskey, R. A. (2010) mRNA export from mammalian cell nuclei is dependent on GANP, *Curr Biol* 20, 25-31.
- [57] Umlauf, D., Bonnet, J., Waharte, F., Fournier, M., Stierle, M., Fischer, B., Brino, L., Devys, D., and Tora, L. (2013) The human TREX-2 complex is stably associated with the nuclear pore basket, *J Cell Sci* 126, 2656-2667.
- [58] Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H. J., and Dirks, R. W. (2004) Poly(A)⁺ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells, *J Cell Biol* 165, 191-202.
- [59] Dias, A. P., Dufu, K., Lei, H., and Reed, R. (2010) A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains, *Nat Commun* 1, 97.
- [60] Sheinberger, J., and Shav-Tal, Y. (2013) The dynamic pathway of nuclear RNA in eukaryotes, *Nucleus* 4, 195-205.

- [61] Jani, D., Lutz, S., Hurt, E., Laskey, R. A., Stewart, M., and Wickramasinghe, V. O. (2012) Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export, *Nucleic Acids Res* 40, 4562-4573.
- [62] Huang, Y., and Steitz, J. A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA, *Mol Cell* 7, 899-905.
- [63] Kubitscheck, U., and Siebrasse, J. P. (2017) Kinetics of transport through the nuclear pore complex, *Semin Cell Dev Biol* 68, 18-26.
- [64] Lee, E. S., Wolf, E. J., Smith, H. W., Emili, A., and Palazzo, A. F. (2019) TPR is required for the nuclear export of mRNAs and lncRNAs from intronless and intron-poor genes, *bioRxiv*, 740498.
- [65] Palazzo, A. F., and Lee, E. S. (2018) Sequence Determinants for Nuclear Retention and Cytoplasmic Export of mRNAs and lncRNAs, *Front Genet* 9, 440.
- [66] Lee, E. S., Akef, A., Mahadevan, K., and Palazzo, A. F. (2015) The consensus 5' splice site motif inhibits mRNA nuclear export, *PLoS One* 10, e0122743.
- [67] Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., and Drummen, G. P. C. (2019) Super-resolution microscopy demystified, *Nat Cell Biol* 21, 72-84.
- [68] Los, G. V., and Wood, K. (2007) The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis, *Methods Mol Biol* 356, 195-208.
- [69] England, C. G., Luo, H., and Cai, W. (2015) HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications, *Bioconjug Chem* 26, 975-986.
- [70] Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., and Wood, K. V. (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis, *ACS Chem Biol* 3, 373-382.
- [71] Liu, Z., and Tjian, R. (2018) Visualizing transcription factor dynamics in living cells, *J Cell Biol* 217, 1181-1191.
- [72] Presman, D. M., Ball, D. A., Paakinaho, V., Grimm, J. B., Lavis, L. D., Karpova, T. S., and Hager, G. L. (2017) Quantifying transcription factor binding dynamics at the single-molecule level in live cells, *Methods* 123, 76-88.

- [73] Young, L. J., Strohl, F., and Kaminski, C. F. (2016) A Guide to Structured Illumination TIRF Microscopy at High Speed with Multiple Colors, *J Vis Exp*.
- [74] Tokunaga, M., Imamoto, N., and Sakata-Sogawa, K. (2008) Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells, *Nat Methods* 5, 159-161.
- [75] Lerner, J., Gomez-Garcia, P. A., McCarthy, R. L., Liu, Z., Lakadamyali, M., and Zaret, K. S. (2020) Two-parameter single-molecule analysis for measurement of chromatin mobility, *STAR Protoc* 1, 100223.
- [76] Tinevez, J. Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., and Eliceiri, K. W. (2017) TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking, *Methods* 115, 80-90.
- [77] Monnier, N., Barry, Z., Park, H. Y., Su, K. C., Katz, Z., English, B. P., Dey, A., Pan, K., Cheeseman, I. M., Singer, R. H., and Bathe, M. (2015) Inferring transient particle transport dynamics in live cells, *Nat Methods* 12, 838-840.
- [78] Mor, A., Suliman, S., Ben-Yishay, R., Yunger, S., Brody, Y., and Shav-Tal, Y. (2010) Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells, *Nat Cell Biol* 12, 543-552.
- [79] Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc* 8, 2281-2308.
- [80] Grimm, J. B., Brown, T. A., English, B. P., Lionnet, T., and Lavis, L. D. (2017) Synthesis of Janelia Fluor HaloTag and SNAP-Tag Ligands and Their Use in Cellular Imaging Experiments, *Methods Mol Biol* 1663, 179-188.
- [81] Grimm, J. B., English, B. P., Choi, H., Muthusamy, A. K., Mehl, B. P., Dong, P., Brown, T. A., Lippincott-Schwartz, J., Liu, Z., Lionnet, T., and Lavis, L. D. (2016) Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging, *Nat Methods* 13, 985-988.
- [82] Ernst, D., and Kohler, J. (2013) Measuring a diffusion coefficient by single-particle tracking: statistical analysis of experimental mean squared displacement curves, *Phys Chem Chem Phys* 15, 845-849.
- [83] Merkhofer, E. C., Hu, P., and Johnson, T. L. (2014) Introduction to cotranscriptional RNA splicing, *Methods Mol Biol* 1126, 83-96.
- [84] Bensaude, O. (2011) Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?, *Transcription* 2, 103-108.

- [85] Wieser, S., and Schutz, G. J. (2008) Tracking single molecules in the live cell plasma membrane-Do's and Don't's, *Methods* 46, 131-140.
- [86] Grimm, J. B., English, B. P., Chen, J., Slaughter, J. P., Zhang, Z., Revyakin, A., Patel, R., Macklin, J. J., Normanno, D., Singer, R. H., Lionnet, T., and Lavis, L. D. (2015) A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy, *Nat Methods* 12, 244-250, 243 p following 250.
- [87] Aksenova, V., Smith, A., Lee, H., Bhat, P., Esnault, C., Chen, S., Iben, J., Kaufhold, R., Yau, K. C., Echeverria, C., Fontoura, B., Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2020) Nucleoporin TPR is an integral component of the TREX-2 mRNA export pathway, *Nat Commun* 11, 4577.
- [88] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat Methods* 9, 676-682.
- [89] Michalet, X., and Berglund, A. J. (2012) Optimal diffusion coefficient estimation in single-particle tracking, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 85, 061916.
- [90] Chen, M., Long, Q., Borrie, M. S., Sun, H., Zhang, C., Yang, H., Shi, D., Gartenberg, M. R., and Deng, W. (2021) Nucleoporin TPR promotes tRNA nuclear export and protein synthesis in lung cancer cells, *PLoS Genet* 17, e1009899.
- [91] Kimura, H., Sugaya, K., and Cook, P. R. (2002) The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells, *J Cell Biol* 159, 777-782.
- [92] Griffis, E. R., Craige, B., Dimaano, C., Ullman, K. S., and Powers, M. A. (2004) Distinct functional domains within nucleoporins Nup153 and Nup98 mediate transcription-dependent mobility, *Mol Biol Cell* 15, 1991-2002.
- [93] Maharana, S., Sharma, D., Shi, X., and Shivashankar, G. V. (2012) Dynamic organization of transcription compartments is dependent on functional nuclear architecture, *Biophys J* 103, 851-859.
- [94] Bensidoun, P., Reiter, T., Montpetit, B., Zenklusen, D., and Oeffinger, M. (2021) Nuclear mRNA metabolism drives selective basket assembly on a subset of nuclear pores in budding yeast, *bioRxiv*, 2021.2011.2007.467636.
- [95] Macara, I. G. (2001) Transport into and out of the nucleus, *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-594, table of contents.

- [96] McCloskey, A., Ibarra, A., and Hetzer, M. W. (2018) Tpr regulates the total number of nuclear pore complexes per cell nucleus, *Genes Dev* 32, 1321-1331.
- [97] Furlan, A., Gonzalez-Pisfil, M., Leray, A., Champelovier, D., Henry, M., Le Nezet, C., Bensaude, O., Lefranc, M., Wohland, T., Vandenbunder, B., Bidaux, G., and Heliot, L. (2019) HEXIM1 Diffusion in the Nucleus Is Regulated by Its Interactions with Both 7SK and P-TEFb, *Biophys J* 117, 1615-1625.