



Université de Montréal

**Trafic intracellulaire de l'ARN de la télomérase chez  
*Saccharomyces cerevisiae* : relation entre biogénèse de la  
télomérase et homéostasie des télomères.**

par

Franck Gallardo

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)  
en Biochimie

Février 2010

© Franck Gallardo, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Trafic intracellulaire de l'ARN de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae* : relation  
entre biogénèse de la télomérase et homéostasie des télomères.

présentée par :  
Franck Gallardo

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martine Raymond, président-rapporteur  
Dr Pascal Chartrand, directeur de recherche  
Dr Daniel Zenklusen, membre du jury  
Dr Chantal Autexier, examinateur externe  
Dr Éric Thorin, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le contrôle de la longueur des télomères est une étape critique régissant le potentiel réplicatif des cellules eucaryotes. A cause du problème de fin de réplication, les chromosomes raccourcissent à chaque cycle de division. Ce raccourcissement se produit dans des séquences particulières appelées télomères. La longueur des télomères est en relation directe avec les capacités prolifératives des cellules et est responsable de la limite de division de Hayflick. Cependant, dans certains types cellulaires et dans plus de 90% des cancers, la longueur des télomères va être maintenue par une enzyme spécialisée appelée télomérase. Encore aujourd'hui, comprendre la biogénèse de la télomérase et savoir comment elle est régulée reste un élément clé dans la lutte contre le cancer. Depuis la découverte de cette enzyme en 1985, de nombreux facteurs impliqués dans sa maturation ont été identifiés. Cependant, comment ces facteurs sont intégrés dans le temps et dans l'espace, afin de produire une forme active de la télomérase, est une question restée sans réponse. Dans ce projet, nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle d'étude des voies de biogénèse et de trafic intracellulaire de l'ARN de la télomérase, en condition endogène.

La première étape de mon travail fut d'identifier les facteurs requis pour l'assemblage et la localisation de la télomérase aux télomères en utilisant des techniques d'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH). Nous avons pu montrer que la composante ARN de la télomérase fait la navette entre le noyau et le cytoplasme, en condition endogène, dans les cellules sauvages. Nos travaux suggèrent que ce trafic sert de contrôle qualité puisqu'un défaut d'assemblage de la télomérase conduit à son accumulation cytoplasmique et prévient donc sa localisation aux télomères. De plus, nous avons identifié les voies d'import/export nucléaire de cet ARN.

Dans une deuxième approche, nous avons réussi à développer une méthode de détection des particules télomérasiques *in vivo* en utilisant le système MS2-GFP. Notre

étude montre que contrairement à ce qui a été précédemment décrit, la télomérase n'est pas associée de façon stable aux télomères au cours du cycle cellulaire. En fin de phase S, au moment de la réplication des télomères, la télomérase se regroupe en 1 à 3 foci dont certains colocalisent avec les foci télomériques, suggérant que nous visualisons la télomérase active aux télomères *in vivo*. La délétion des gènes impliqués dans l'activation et le recrutement de la télomérase aux télomères entraîne une forte baisse dans l'accumulation des foci d'ARN au sein de la population cellulaire. Nos résultats montrent donc pour la première fois la localisation endogène de l'ARN *TLCI* *in situ* et *in vivo* et propose une vue intégrée de la biogenèse et du recrutement de la télomérase aux télomères.

**Mots-clés** : télomérase, levure, trafic intracellulaire, dynamique *in vivo*, télomère, cancer.

## Abstract

Telomere length control is a critical step that governs the replicative potential of eukaryotic cells. Due to the end replication problem, chromosomes shorten at each round of division. This attrition occurs in specialized sequences at the extremity of chromosomes called telomeres. Telomere size is in direct relationship with proliferative potential and responsible for Hayflick's division limit. However, in different cell type and in cancers, an end-specialized enzyme called telomerase maintains telomere length. Reactivation of telomerase in somatic cells triggers a pre-tumoral phenotype and more than 90% of cancers highly express this enzyme. Still today, understanding how telomerase is synthesized and reactivated can be a key step for the understanding of cancer arising and progression. Since the discovery of this enzyme in 1985, several factors involved in the regulation of this enzyme have been discovered. However, the spatio-temporal regulation of telomerase biogenesis and regulation has not been determined. We used the yeast *S.cerevisiae* to study the biogenesis and recruitment of telomerase to telomeres.

The first step in my work was to determine the factors required for the biogenesis and recruitment of telomerase to telomeres using fluorescence *in situ* hybridization. We have shown that the telomerase RNA component shuttles between the nucleus and the cytoplasm in wild type endogenous conditions. We have shown that this intracellular trafficking is used as a quality control mechanism that prevents the nuclear localization of miss assembled telomerase complexes. Moreover, we have identified the import/export pathways of the telomerase RNA.

In a second step, we developed an *in vivo* localization system to follow the telomerase RNA dynamics. We used the MS2-GFP system to track this RNA *in vivo*. Our study shows that, contrary to what was previously described, telomerase is not stably associated to telomeres during the cell cycle but freely diffuses in the nucleus of G1 cells. In late S phase, at the moment of telomere replication, telomerase clusters in 1 to 3 big foci

that colocalizes with telomeres clusters *in vivo*, suggesting the visualization of active telomerase particles replicating telomeres. Disruption of gene coding for telomerase activators triggers a great reduction of telomerase RNA clusters in a cell population. Altogether, our results shows for the first time the localization of the endogenous form of the telomerase RNA and propose an integrated view of telomerase biogenesis and recruitment to telomeres.

**Keywords:** telomerase, yeast, intracellular trafficking, *in vivo* dynamics, telomere, cancer

## Table des matières

Liste des tableaux .....	xii
Liste des figures .....	xiii
Abréviations et sigles.....	xviii
Remerciements.....	xxii
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>24</b>
1. Le mécanisme de réplication de l'ADN.....	25
1.1 Historique : .....	26
1.2 Mécanistique.....	27
1.3 Problème de fin de réplication .....	30
1.4 Conséquences du problème de fin de réplication, la sénescence réplivative.....	32
2. Structure des télomères humains.....	34
2.1 La shelterine recouvre les télomères humains.....	37
2.1.1 TRF1 et TRF2.....	38
2.1.2 RAP1 .....	39
2.1.3 TPP1/POT1 .....	40
2.1.4 TIN2.....	40
2.1.5 Facteurs accessoires de la shelterine.....	41
2.2 Fonctions associées à la shelterine.....	42
3. Structure de la télomérase humaine.....	44
3.1 Historique : .....	44
3.2 Structure de la télomérase humaine active.....	46
3.2.1 La sous-unité catalytique hTERT.....	47
3.2.2 L'ARN <i>hTR</i> .....	48
3.2.3 La dyskérine.....	50
3.2.4 hEST1.....	51
3.3 La télomérase au centre du processus de formation des tumeurs.....	53

4. <i>S.cerevisiae</i> comme modèle d'étude de la télomérase.....	54
5. Structures et fonctions des télomères de <i>S.cerevisiae</i> .....	55
5.1 Rap1p.....	57
5.2 Le complexe Sir2/3/4p.....	60
5.3 Le complexe Rif1p/Rif2p.....	61
5.4 Le complexe yKu70/80p.....	62
5.5. Le complexe CST: Cdc13p-Stn1p-Ten1p.....	63
5.5.1 Cdc13p.....	63
5.5.2 Stn1p.....	64
5.5.3 Ten1p.....	65
5.6 Regroupement des télomères à la périphérie du noyau.....	66
5.7 TERRA : <i>Telomeric-repeat containing</i> RNA.....	68
5.8 Réplication des télomères et synthèse de l'extrusion 3' chez <i>S.cerevisiae</i> .....	70
6. La télomérase de <i>S.cerevisiae</i> .....	74
6.1 L'ARN <i>TLCl</i> , squelette et matrice de la télomérase.....	74
6.2 La télomérase, un complexe ribonucléoprotéique.....	76
6.2.1 Est2p.....	77
6.2.2 Est1p.....	79
6.2.3 Est3p.....	80
6.2.4 yKu70p/80p.....	81
6.3 L'inhibition locale de la régulation négative induit le recrutement préférentiel de la télomérase aux télomères courts en fin de phase S.....	83
6.4 Terminaison de l'élongation des télomères.....	89
6.5 Dynamique de l'association télomère-télomérase au cours du cycle cellulaire chez <i>S.cerevisiae</i> .....	89
7. Localisation intracellulaire des composants de la télomérase chez les mammifères.....	91
8. Localisation intracellulaire des composants de la télomérase chez la levure.....	94
9. Trafic nucléo-cytoplasmique des ARN.....	99

9.1 Mécanisme général d'import nucléaire.....	101
9.2 Mécanisme général d'export des ARN.....	102
10. Description du système MS2 pour le suivi des ARNm <i>in vivo</i> .....	104
11. Hypothèses et objectifs de travail.....	107
<b>METHODES</b> .....	109
1. Souches et plasmides.....	110
2. Méthodes utilisées dans le chapitre 1.....	110
2.1 Fixation des cellules :.....	110
2.2 Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	111
2.3 Protocole couplé de <i>FISH</i> et d'immunofluorescence.....	111
2.4 Acquisition des images, déconvolution et post-traitement.....	112
2.5 Essai de trafic nucléocytoplasmique par formation d'hétérokarya.....	113
2.6 Analyse de l'expression des ARN par RT-PCR quantitative.....	113
2.7 Immunoprécipitation des ARN contenant des coiffes tri-méthylées.....	114
3. Méthodes utilisées dans le chapitre 2.....	115
3.1 Insertion des tiges MS2 dans la section 3' de <i>TLC1</i> .....	115
3.2 Test de complémentation.....	115
3.3 Analyse de la longueur des télomères par Southern-blot.....	115
3.4 Analyse de l'expression des ARN par Northern-blot.....	116
3.5 Extraction des protéines, immunoprécipitation et essai d'activité télomérase. ...	116
3.6 Imagerie des cellules vivantes.....	117
3.7 Suivi des particules de <i>TLC1</i> -GFP, quantification et calcul des paramètres physiques.....	118
<b>RESULTATS</b> .....	120
<b>Chapitre 1</b> : détection de la localisation endogène de l'ARN <i>TLC1</i> par Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	121

1.1 L'ARN <i>TLC1</i> se regroupe en 6 à 10 foci dans le noyau des cellules sauvages...	121
1.2 L'ARN <i>TLC1</i> colocalise avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire..	123
1.3 La délétion des gènes codant pour les Estp ou yKu70/80p induit une accumulation cytoplasmique de l'ARN <i>TLC1</i> .....	125
1.4 La délétion des gènes codant pour les protéines Estp ou yKu n'a pas d'influence sur l'expression et la maturation de l'ARN <i>TLC1</i> . ....	128
1.5 Le complexe yKu70/80p est critique pour la localisation nucléaire de l'ARN <i>TLC1</i> .....	130
1.6 Un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères prévient l'accumulation nucléaire de l'ARN <i>TLC1</i> . ....	132
1.7 L'ARN <i>TLC1</i> fait la navette entre le noyau et le cytoplasme en condition endogène. ....	135
1.8 L'ARN <i>TLC1</i> mature est exporté par une nouvelle voie Crm1p dépendante. ....	138
1.9 L'ARN <i>TLC1</i> est importé dans le noyau par une voie Kap122p/Mtr10p dépendante.....	143
1.10 La protéine Tgs1p hyperméthyle la coiffe de l'ARN <i>TLC1</i> dans le nucléole....	145
<b>Chapitre 2</b> : détection de la localisation endogène de l'ARN <i>TLC1 in vivo</i> par utilisation du système MS2. ....	148
2.2 La construction <i>TLC1-10xMS2</i> complémente parfaitement une délétion du gène <i>TLC1</i> .....	148
2.3 Dynamique de l'ARN <i>TLC1</i> en phase G1 et G2 du cycle cellulaire. ....	155
2.4 Dynamique de l'ARN <i>TLC1</i> en phase S du cycle cellulaire. ....	161
2.5 Le T-rex adopte le comportement du télomère en fin de phase S du cycle cellulaire.....	163
2.6 L'apparition de T-rex est restreinte à la fin de la phase S et entre 1 et 3 foci peuvent être détectés <i>in vivo</i> . ....	166
2.7 Les T-rex colocalisent stablement avec les foci télomériques en phase S tardive du cycle cellulaire. ....	168

2.8 La pénétrance des T-rex est modifiée en cas d'altération de l'activité télomérase. .....	170
<b>DISCUSSION</b> .....	173
1. L'ARN <i>TLC1</i> colocalise avec les télomères <i>in situ</i> . .....	174
2. Un assemblage hiérarchique de la télomérase contrôle la qualité des complexes enzymatiques produits.....	175
3. <i>TLC1</i> fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. ....	178
4. L'hyperméthylation de la coiffe serait essentielle à la localisation de l'ARN <i>TLC1</i> . .....	181
5. Modèle du trafic intracellulaire de l'ARN <i>TLC1</i> au cours de sa biogénèse.....	182
6. Le comportement de l'ARN <i>TLC1 in vivo</i> est fondamentalement différent de sa localisation dans les cellules fixées. ....	183
7. L'ARN <i>TLC1</i> se regroupe sous la forme de T-rex, de nouveaux corps nucléaires représentant une télomérase active en élongation. ....	185
<b>PERSPECTIVES</b> .....	192
1. La localisation de l'ARN <i>TLC1</i> est régulée en fonction du cycle cellulaire.....	193
2. Existe-t-il un trafic intranucléaire dans les cellules vivantes ? .....	195
3. Vers une répartition active des stocks d'ARN <i>TLC1</i> en mitose ?.....	197

## Liste des tableaux

TABLE 1 : PARAMÈTRES PHYSIQUES DES DÉPLACEMENTS DE L'ARN <i>TLC1</i> PAR RAPPORT AU TÉLOMÈRE DANS LES PHASES G1 ET G2 DU CYCLE CELLULAIRE.....	158
TABLE 2 : PARAMÈTRES PHYSIQUES DES DÉPLACEMENTS DE L'ARN <i>TLC1</i> PAR RAPPORT AU TÉLOMÈRE DANS LA PHASE S TARDIVE DU CYCLE CELLULAIRE.....	164

## Liste des figures

FIGURE 1 : RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE EUCARYOTES, EXEMPLE DE LA LEVURE DE BOULANGER <i>S.CEREVISIÆ</i> .	25
FIGURE 2 : ILLUSTRATION DU MÉCANISME DE RÉPLICATION DU BRIN DIRECT ET DU BRIN RETARDÉ	28
FIGURE 3 : VUE SIMPLIFIÉE DES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPLICATION DE L'ADN CHEZ LES EUCARYOTES.	29
FIGURE 4 : EXPLICATION SIMPLIFIÉE DU PROBLÈME DE FIN DE RÉPLICATION.	31
FIGURE 5 : EXEMPLE DE CONFIGURATION EN BOUCLE T ET BOUCLE D OBSERVÉ POUR LES TÉLOMÈRES HUMAINS.	36
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION DU COMPLEXE SHELTERINE ASSOCIÉ AUX TÉLOMÈRES.	37
FIGURE 7 : EXEMPLE DE FUSION CHROMOSOMIQUE INDUITE PAR LA PERTE DE FONCTION TÉLOMÉRIQUE.	42
FIGURE 8 : LA PERTE DE PROTECTION DES TÉLOMÈRES S'ACCOMPAGNE D'UNE ACTIVATION DES VOIES DE DOMMAGE À L'ADN.	44
FIGURE 9 : DIFFÉRENTS MOTIFS SONT PRÉSENTS DANS HTRT.	47
FIGURE 10 : STRUCTURE DE L'ARN HTR ET SÉQUENCE DE LA BOITE CAB.	49
FIGURE 11 : SCHÉMA DU COMPLEXE TÉLOMERASE CHEZ L'HUMAIN.	52
FIGURE 12 : SCHÉMA SIMPLIFIÉE DE LA STRUCTURE TÉLOMÉRIQUE CHEZ <i>S.CEREVISIÆ</i> .	55
FIGURE 13 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ DES FACTEURS PRÉSENTS EN POSITION TÉLOMÉRIQUE ET SUB-TÉLOMÉRIQUE.	56
FIGURE 14 : DESCRIPTION DES RÔLES DIFFÉRENTIELS DE RAP1P DANS LA RÉPRESSION ET L'ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION.	58
FIGURE 15 : L'INHIBITION DE L'ANCRAGE DES PROTEINES RIF AUX TELOMERES ENTRAINE UNE PERTE DE REGROUPEMENT <i>IN SITU</i> .	67
FIGURE 16 : MODÈLE PROPOSÉ DE LA RÉGULATION DE LA LONGUEUR DES TÉLOMÈRES PAR LES TERRA.	70
FIGURE 17 : ILLUSTRATION DU PHÉNOMÈNE DE RÉSECTION DU BRIN RICHE EN C.	73
FIGURE 18 : STRUCTURE SECONDAIRE PROPOSÉE POUR L'ARN <i>TLC1</i> ET DEGRÉ DE CONSERVATION ENTRE LES ESPÈCES DE <i>SACCHAROMYCES</i> .	75
FIGURE 19 : DESCRIPTION DES MOTIFS RÉTRO-TRANSCRIPTASES DANS LE DOMAINE RT DE EST2P.	78

FIGURE 20 : ILLUSTRATION DES FONCTIONS ET DES SITES DE LIAISONS DES PROTÉINES EST ET DU COMPLEXE YKU70/80 SUR L'ARN <i>TLC1</i> .....	83
FIGURE 21 : ILLUSTRATION DU MÉCANISME DE COMPTAGE QUI SERAIT RESPONSABLE DU RECRUTEMENT PRÉFÉRENTIEL DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES LES PLUS COURTS. ....	85
FIGURE 22 : ILLUSTRATION DU RECRUTEMENT HIÉRARCHIQUE DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES.....	87
FIGURE 23 : ILLUSTRATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE CDC13P PARTICIPANT À LA RÉGULATION DE LA TÉLOMÉRASE EN FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE.	88
FIGURE 24 : MODÈLE DU RECRUTEMENT ET DE L'ACTIVATION DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ <i>S.CEREVISIAE</i> .....	90
FIGURE 25 : HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DIRIGÉE CONTRE L'ARN <i>HTR</i> DANS LES CELLULES HELA EN FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE.....	92
FIGURE 26: MODÈLE PROPOSÉ DE LA LOCALISATION DE <i>HTR</i> ET <i>HTERT</i> EN FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES CELLULES HELA.....	93
FIGURE 27 : LES PROTÉINES EST S'ACCUMULENT DANS LE NUCLÉOLE ET L'ARN <i>TLC1</i> S'ACCUMULE DANS LE NOYAU EN CONDITION DE SUREXPRESSION.....	96
FIGURE 28 : MODÈLE PROPOSÉ DE LA LOCALISATION DE L'ARN <i>TLC1</i> EN CONDITION DE SUREXPRESSION CHEZ <i>S.CEREVISIAE</i> .....	98
FIGURE 29 : ILLSUTRATION DE LA COMPOSITION DU NPC CHEZ LA LEVURE ET CHEZ LES MAMMIFÈRES.....	100
FIGURE 30 : MÉCANISME GÉNÉRAL DE L'IMPORT NUCLÉAIRE DES PROTÉINES.....	102
FIGURE 31 : EXPORT DES ARNM CHEZ <i>S.CEREVISIAE</i> .....	103
FIGURE 32 : DESCRIPTPION DU SYSTÈME MS2-GFP POUR LE SUIVI DES ARN <i>IN VIVO</i> .....	106
FIGURE 33 : LOCALISATION DE L'ARN <i>TLC1</i> EN CONDITION ENDOGÈNE DANS DES SOUCHES SAUVAGES ET $\Delta$ <i>TLC1</i> .....	122
FIGURE 34 : COLOCALISATION ENTRE L'ARN <i>TLC1</i> ET LES REGROUPEMENTS TÉLOMÉRIQUES IDENTIFIÉS PAR IMMUNOFLUORESCENCE CONTRE LE MARQUEUR TÉLOMÉRIQUES RAP1P..	123
FIGURE 35 : LA DELETION <i>RIF1</i> OU <i>RIF2</i> INDUIT UNE AUGMENTATION DU NOMBRE DE FOCI D'ARN <i>TLC1</i> DETECTES DANS LES NOYAUX DES CELLULES.....	125
FIGURE 36 : LA DÉLÉTION DES GÈNES EST INDUIT UNE ACCUMULATION CYTOPLASMIQUE DE L'ARN <i>TLC1</i> .....	126
FIGURE 37 : LE COMPLEXE YKU70/80P EST ESSENTIEL À LA LOCALISATION NUCLÉAIRE DE L'ARN <i>TLC1</i> .....	127

FIGURE 38 : QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE L'ARN *TLC1* DANS LES DIFFÉRENTS MUTANTS EST ET YKU70..... 128

FIGURE 39 : LA MATURATION DE LA COIFFE DE L'ARN *TLC1* N'EST PAS ALTÉRÉE DANS LES MUTANTS ESTP ET YKU..... 129

FIGURE 40 : LA SUREXPRESSION DE *EST1* ET *2* COMPLÈTE LEUR DÉLÉTION MAIS NE COMPLÈTE PAS UNE DÉLÉTION DU GÈNE *YKU70* POUR L'ACCUMULATION NUCLÉAIRE DE L'ARN *TLC1*..... 131

FIGURE 41 : L'ALTÉRATION DU RECRUTEMENT DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES MODIFIE LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE L'ARN *TLC1*. ..... 133

FIGURE 42 : PÉNÉTRANCE DU PHÉNOTYPE D'ACCUMULATION CYTOPLASMIQUE DANS LES MUTANTS DÉFECTIFS POUR LE RECRUTEMENT DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES. .... 134

FIGURE 43 : LES HÉTÉROKARYA NE PRÉSENTENT PAS DE FUITE NUCLÉAIRE DANS NOS CONDITIONS EXPÉRIMENTALES..... 136

FIGURE 44 : L'ARN *TLC1* FAIT LA NAVETTE ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME EN CONDITION ENDOGÈNE..... 137

FIGURE 45 :L'ARN *TLC1* N'EST PAS EXPORTÉ PAR UNE VOIE MEX67P DÉPENDANTE. .... 138

FIGURE 46 : L'ARN *TLC1* EST EXPORTÉ PAR UNE VOIE CRM1P DÉPENDANTE. .... 139

FIGURE 47 : QUANTIFICATION DE LA PÉNÉTRANCE DU PHÉNOTYPE DE RESTAURATION NUCLÉAIRE OBSERVÉ POUR L'ARN *TLC1* DANS LES SOUCHES *CRM1*. .... 140

FIGURE 48 : LE BLOCAGE DE L'EXPORT NUCLÉAIRE DE L'ARN *TLC1* N'ENTRAÎNE PAS DE DÉFAUTS DE MATURATION DE CET ARN. .... 141

FIGURE 49 : L'ARN *TLC1* EST EXPORTÉ INDÉPENDAMMENT DE L'EXPORT DES PARTICULES PRÉ-RIBOSOMIQUES..... 142

FIGURE 50 : LA DÉLÉTION DES IMPORTINES MTR10P ET KAP122P INDUIT UN DÉFAUT D'IMPORT DE L'ARN *TLC1*..... 143

FIGURE 51 : QUANTIFICATION DE LA PÉNÉTRANCE DU PHÉNOTYPE D'ACCUMULATION CYTOPLASMIQUE OBSERVÉ POUR L'ARN *TLC1* DANS LES SOUCHES DÉLÉTÉES POUR LES DIFFÉRENTES IMPORTINES..... 144

FIGURE 52 : LA MATURATION DE LA COIFFE DE L'ARN *TLC1* EST ALTÉRÉE DANS UN MUTANT  $\Delta$ *TGS1*. ..... 145

FIGURE 53 : L'ARN *TLC1* S'ACCUMULE DANS LE NUCLÉOLE DES CELLULES  $\Delta$ *TGS1*..... 146

FIGURE 54 : ILLUSTRATION DU SYSTÈME À DEUX COMPOSANTE UTILISÉ POUR SUIVRE LA LOCALISATION DE L'ARN *TLC1* *IN VIVO*. ..... 149

FIGURE 55 : LA CONSTRUCTION <i>TLC1</i> -GFP RESTAURE LE PHÉNOTYPE DE SÉNESCENCE OBSERVÉ DANS DES CELLULES $\Delta$ <i>TLC1</i> .....	150
FIGURE 56 : MESURE DE LA LONGUEUR DES TÉLOMÈRES DANS LES SOUCHES COMPLÉMENTÉES PAR LA VERSION <i>TLC1</i> -10XMS2.....	151
FIGURE 57 : LA CONSTRUCTION <i>TLC1</i> -10XMS2 EST EXPRIMÉE À DES NIVEAUX QUASI SAUVAGE PAR RAPPORT À UNE CONSTRUCTION WT. ....	152
FIGURE 58 : LA CONSTRUCTION <i>PTLC1</i> -10XMS2 PRÉSENTE UNE ACTIVITÉ TÉLOMÉRASE SAUVAGE. .....	153
FIGURE 59 : LA POSITION DES FOCI MS2-GFP VISUALISÉS DANS LES CELLULES VIVANTES CORRESPOND À LA POSITION DE L'ARN <i>TLC1</i> <i>IN SITU</i> . ....	154
FIGURE 60 : DYNAMIQUE DE L'ARN <i>TLC1</i> DANS LES CELLULES VIVANTES EN G1 ET G2.....	156
FIGURE 61 : DESCRIPTION DU SYSTÈME UTILISÉ POUR DÉTECTER LA POSITION DU TÉLOMÈRE IV <sub>R</sub> <i>IN</i> <i>VIVO</i> . ....	157
FIGURE 62 : COURBE DE MSD IDÉALES OBTENUES PAR DES ARNM ET EXEMPLES DE TRAJECTOIRES. .....	159
FIGURE 63 : MSD OBSERVÉ POUR L'ARN <i>TLC1</i> EN PHASE G1 ET G2 DU CYCLE CELLULAIRE COMPARÉ AU MSD DU TÉLOMÈRE IV <sub>R</sub> . ....	160
FIGURE 64 : DYNAMIQUE DE L'ARN <i>TLC1</i> DANS LES CELLULES VIVANTES EN PHASE S TARDIVE. ....	162
FIGURE 65: MSD OBSERVÉ POUR L'ARN <i>TLC1</i> EN PHASE G1, G2 ET S DU CYCLE CELLULAIRE COMPARÉ AU MSD DU TÉLOMÈRE IV <sub>R</sub> . ....	165
FIGURE 66 : ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DES T-REX AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE. ....	166
FIGURE 67 : PLUSIEURS T-REX PEUVENT ÊTRE DÉTECTÉS DANS LE NOYAU DES CELLULES SAUVAGES EN PHASE S TARDIVES. ....	167
FIGURE 68 : L'ARN <i>TLC1</i> EST ASSOCIÉ AUX TÉLOMÈRES UNIQUEMENT EN PHASE S TARDIVE <i>IN</i> <i>VIVO</i> . ....	169
FIGURE 69 : UN DÉFAUT DE RECRUTEMENT DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES DIMINUE FORTEMENT LE TAUX DE FORMATION DE T-REX EN PHASE S TARDIVE. ....	171
FIGURE 70 : LA DÉLÉTION DES RÉGULATEURS NÉGATIFS <i>RIF1</i> ET <i>RIF2</i> ABOLIT LA RÉGULATION DE LA FORMATION DES T-REX EN FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE.....	172
FIGURE 71 : MODÈLE PROPOSÉ DE LA VOIE DE BIOGÉNÈSE DE L'ARN DE LA TÉLOMÉRASE CHEZ <i>S.CEREVISIÆ</i> .....	182
FIGURE 72 : MODÈLE PROPOSÉ POUR LE RECRUTEMENT DE LA TÉLOMÉRASE AUX TÉLOMÈRES <i>IN</i> <i>VIVO</i> . ....	187

FIGURE 73 : MODÈLE DE L'INTÉRACTION TÉLOMÈRE/TÉLOMÉRASE AU COURS DES PHASES G1 ET S TARDIVE DU CYCLE CELLULAIRE.....	189
FIGURE 74 : ÉTUDE DE LA LOCALISATION DE L'ARN <i>TLC1</i> PAR <i>FISH</i> AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE. ....	194
FIGURE 75 : LOCALISATION DE L'ARN DE LA TÉLOMÉRASE, DES TÉLOMÈRES ET DU NUCLÉOLE DANS DIFFÉRENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE DE CELLULES VIVANTES.....	197
FIGURE 76 : LOCALISATION DE L'ARN <i>TLC1</i> ET DES MICROTUBULES LORS DE L'ANAPHASE DANS UNE CELLULE SAUVAGE VIVANTE.....	198

## Abréviations et sigles.

$\mu$  : micro-, millionième d'unité ( $10^{-6}$ )

A : adénosine

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNg : acide désoxyribonucléique génomique

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomal

ALT : *alternative lengthening of telomeres*

ARN : acide ribonucléoprotéique

ARNt : acide ribonucléoprotéique de transfert

ARNr : acide ribonucléoprotéique ribosomal

ARS : *autonomously replicating sequence*

b, pb, kb : base, paire de base, kilobase

BSA : *bovine serum albumin*

C : cytosine

CCD : *charge coupled device*

CDB : cassure double brin

ChIP : Immunoprécipitation de chromatine.

Complexe RNP : complexe ribonucléoprotéique

Da, KDa : Dalton, kiloDalton.

DAPI : diamidino phényl-indol

DEPC : di-éthyl pyrocarbonate

dNTP : désoxyribonucléotide tri-phosphate

DO : densité optique

*E.coli* : *Escherichia coli*

EDTA : éthylène diamine tétraacétique

FISH : Hybridation *In Situ* en Fluorescence.

g : grammes

G: guanosine

NAD: nicotinamide adenine dinucléotide

nt : nucléotide

MSD : *mean square displacement*

NHEJ : *non homologous end-joining*

NP-40 : nonidet P40

NPC : complexe de pore nucléaire

ORF : *open reading frame*, cadre de lecture ouvert

PBS : *phosphate buffer saline*

pGal : promoteur du gène Gal

PSF : *point spread function*

RFP/YFP/GFP/CFP : *Red/Yellow/Green/Cyan Fluorescent Proteins*

RH : recombinaison homologue

RT : rétro-transcription, rétro-transcriptase

S : Svedberg, unité de centrifugation

scaARN : ARN associé aux corps de Cajal (*small Cajal bodies associated ARN*)

SDS : sodium dodecyl sulfate

snARN : petit ARN nucléaire (*Small nuclear*)

snoARN : petit ARN nucléolaire (*Small nucleolar*)

STEX : *single telomere extension assay*

SV40 : *simian virus 40*

T : thymine

Ts : thermosensible

TPE : effet de position des télomères

T-rex : *telomerase recruitment and extension*

U : uracile

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

*Ce qui est vrai pour E.coli est vrai pour un éléphant.*

*Jacques Monod*

*À la mémoire de mon oncle, Philippe Brunck (1952-2009).*

## Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Dr Pascal Chartrand pour son aide et son soutien au cours de mon doctorat. Pascal a toujours été présent pour discuter de science ou d'autres sujets et d'une aide précieuse dans les moments difficiles. Ses qualités scientifiques m'ont permis d'avancer dans mon développement professionnel et personnel. Son dévouement pour la science est exemplaire.

Je voudrai remercier également mes collègues et amis du laboratoire, passé et présent, à savoir, Yannick Sylvestre, Nicolas Paquin, Zhifa Shen (alias Mr CHIP), Anne-Laure Finoux, Anick et tous les autres membres du labo.

Un remerciement tout particulier à Emmanuelle Querido, Miss Tracking, pour nos discussions, critiques et commentaires sur les articles de microscopie en cellule vivante et sur nos collaborations.

Je voudrai remercier également Mme Catherine Olivier qui a fait un travail remarquable sur la mise au point de la technique de *FISH* et sans qui rien n'aurait été possible.

Je voudrai remercier les membres de mon comité de thèse et du comité de défense, Le Dr Gérardo Ferbeyre pour sa bonne humeur et ses conseils avisés, le Dr Pierre Belhumeur pour sa disponibilité et son implication, les Dr Raymond, Autexier, Zenklusen pour avoir accepté d'évaluer cette thèse mais également pour nos discussions sur les levures, la télomérase et sur la localisation dans les cellules vivantes. Merci au Dr Thorin pour avoir accepté de participer au jury.

Je remercie mes collaborateurs : le Dr Wellinger, Nancy Laterreur, Dr Francois Bachand, Dr Eric Gilson, Dr Jeff Boeke, pour la productivité de nos projets communs et pour la qualité de la recherche qu'ils produisent.

Je remercie mes amis : Mathieu Soussoulayres, Yannick Ricordeau (Mr Domino), Laurence fleury, Lou-Lou, Lisa Danielzack, Nicolas Chabot, Mathieu Vernier, Vincent de Guire (alias Johnny), Éric Bonneau, Antoine roux, Isabelle Fernandez, Florent Bernard, Karine, Sasha, Véro, Gabriel et tous les autres pour nos moments passés à refaire le monde et à raconter des blagues nulles. Également un gros merci à toute l'équipe de rugby du département de biochimie et à mes partenaires de squash.

Je remercie tout le personnel administratif du département (Denise, Sylvie, Lorraine) pour leur patience et leur efficacité constante. Je remercie Suzanne et Louise de la cafétéria pour les hectolitres de café qu'elles m'ont servis au cours de mon doctorat.

Finalement, je remercie toute ma famille et belle-famille pour leur soutien permanent tout au long de mes études Martial, Hélène, Jacques, Claudie (alias Monique), Christine, Marco, ma petite nièce Djezabel (Yaya) et tous les autres. Votre support a été essentiel tout au long de ce parcours et je vous serai redevable éternellement.

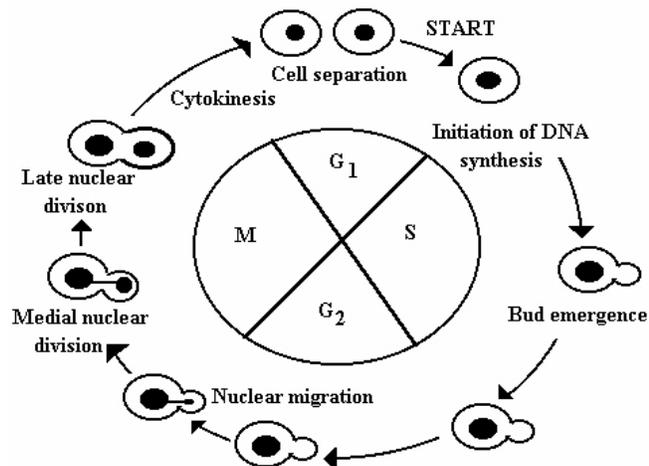
Pour conclure, je remercie ma femme, Perrine, pour son soutien et sa compréhension quand il fallait partir au labo à 7h du matin un dimanche, mais aussi pour avoir tenu bon, la tête haute, pendant ces 4 années à Montréal. A deux, tout est réalisable.

*Merci pour tout.*

# **INTRODUCTION**

## 1. Le mécanisme de réplication de l'ADN.

La division cellulaire est un processus universel et excessivement contrôlé qui a conduit au développement des organismes pluricellulaires que nous connaissons aujourd'hui. Alors que chez les procaryotes, les mécanismes de réplication de l'ADN et de division cellulaire sont couplés, les eucaryotes ont développé une méthode de division répartie sur plusieurs phases distinctes, correspondant à différentes étapes spécifiques, appelée cycle cellulaire. Ce cycle cellulaire est composé de l'interphase (regroupant les phases G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>) où la cellule double son contenu en ADN en le répliquant, puis se prépare à la phase active et morphologiquement observable de la division : la mitose (Fig.1). Lors de cette phase, la cellule mère répartit son contenu (ADN et organelles) en deux cellules filles, identiques dans la plupart des cas. La cellule fille doit recevoir de la cellule mère une copie la plus parfaite possible de son ADN, ce phénomène étant contrôlé par la cellule mère lors de la réplication et de la séparation des chromosomes.



**Figure 1 : résumé des différentes phases du cycle cellulaire eucaryotes, exemple de la levure de boulanger *S.cerevisiae*.**

Le cycle cellulaire contient 2 phases distinctes, l'interphase et la mitose. L'interphase contient les phases G<sub>1</sub> (Gap1), S (synthèse), et G<sub>2</sub>. Il n'y a pas de condensation des

chromosomes en mitose chez *S.cerevisiae* ni de disruption de l'enveloppe nucléaire, la mitose est donc fermée. Tiré de [http://www2.hawaii.edu/~alices\\_v/life2.jpg](http://www2.hawaii.edu/~alices_v/life2.jpg)

## 1.1 Historique.

Depuis la découverte de la structure de l'ADN en 1953 (Watson & Crick, 1953), les chercheurs ont pu imaginer comment les cellules pouvaient répliquer leur matériel génétique et proposer des mécanismes. En effet, l'ADN étant composé de 2 brins de nucléotides s'appariant entre eux sous forme de double hélice, certains auteurs ont supposé que chacun des 2 brins donne naissance à un nouveau brin identique suite à la réplication, et que l'ensemble brin matrice/brin néo-synthétisé est transmis aux cellules mères et filles. La fonction de l'ADN repose donc d'une part sur le codage génétique qu'il contient mais va également dépendre de sa propre réplication. Les premières hypothèses du concept de réplication de l'ADN appelé semi-conservatif (un brin des deux brins de la cellule fille est celui de la cellule mère) ont émergées (Meselson & Stahl, 1958), et plusieurs modèles de réplication ont été proposés.

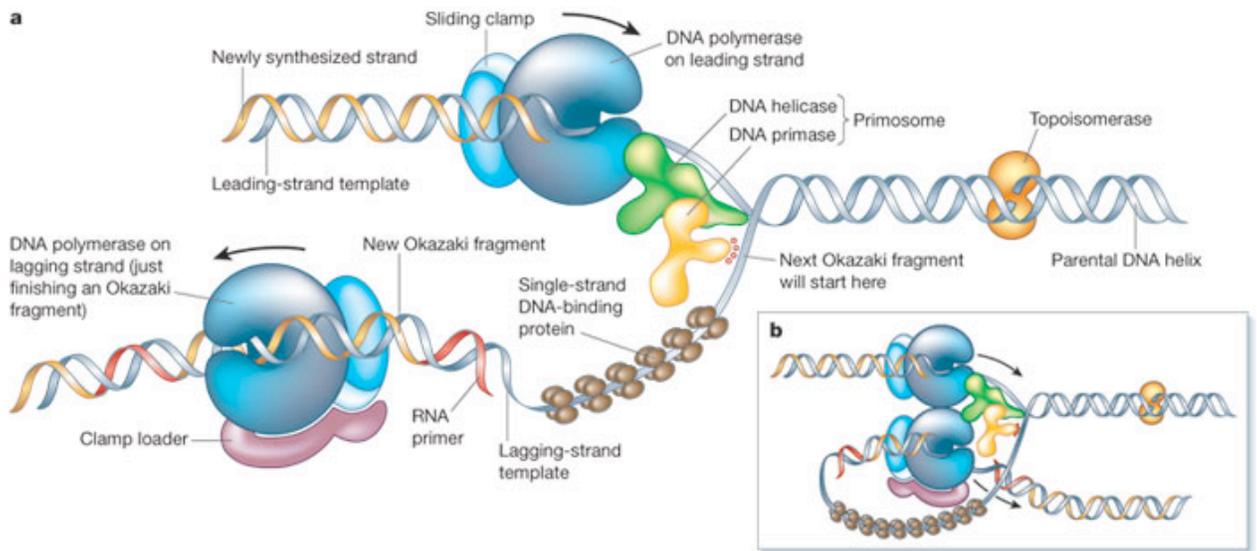
Suite à la découverte de l'ADN, Bessamn, Kornberg et coll., en 1956, ont découvert une enzyme appelée ADN polymérase qui avait la capacité de recopier un fragment d'ADN (appelé matrice) en un fragment identique par incorporation de dNTP (Bessman et al, 1956). Cette découverte octroya à Kornberg le prix Nobel de Médecine en 1959. Ces ADN polymérases ne peuvent synthétiser de l'ADN que dans une seule orientation (5'-3') ce qui apporta un dilemme pour le mécanisme de réplication. En effet, pour que les fragments d'ADN soient répliqués au sein de la fourche de réplication, une enzyme devrait polymériser dans le sens 5'-3' et l'autre dans le sens opposé 3'-5', puisque les brins de la

double hélice d'ADN sont antiparallèles. Cependant, les ADN polymérase 3'-5' n'existent pas. Quels moyens sont donc utilisés pour assurer la réplication des deux brins ?

Dix ans plus tard, en 1966, Okazaki et coll. ont résolu cette énigme en montrant la réplication discontinue du brin retardé (Sakabe & Okazaki, 1966). En effet, cette étude a montré que la réplication nécessitait l'action coordonnée de deux machineries de réplication. La première synthétise le brin direct et avance dans le même sens de progression de la fourche de réplication. Le deuxième brin, quant à lui, est synthétisé en sens inverse de progression de la fourche et est appelé brin retardé. La synthèse du brin retardé est générée par la polymérisation et la ligation de différents fragments d'ADN. Ces fragments d'ADN produits par la synthèse du brin retardé sont nommés fragments d'Okazaki.

## **1.2 Mécanistique.**

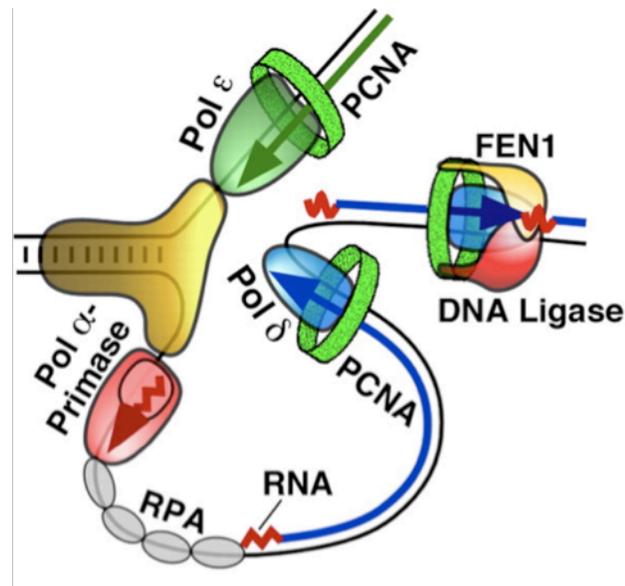
La réplication de l'ADN est l'évènement majeur de la phase S du cycle cellulaire. A la suite de l'activation d'une origine de réplication, la fourche de réplication va s'ouvrir et progresser de façon bidirectionnelle jusqu'à ce qu'elle rencontre soit une autre fourche soit l'extrémité du chromosome (Fig. 2). La réplication totale du génome est la résultante d'une coopération harmonieuse entre les deux machineries de réplifications séparées dans l'espace et dans le temps.



**Figure 2 : illustration du mécanisme de réplication du brin direct et du brin retardé.**

A) illustration de la fourche de réplication eucaryote. Les deux machineries de réplication sont représentées de façon simple. B) Un repliement du brin retardé conduit à la progression unidirectionnelle de la fourche. Tiré de (Alberts, 2003).

Parmi les nombreuses ADN polymérases présentes dans le noyau cellulaire, Pol  $\delta$  et  $\epsilon$  sont des composants de la machinerie de réplication normale des chromosomes. Pol  $\delta$  a été impliquée dans la réplication du brin retardé et Pol  $\epsilon$  dans la réplication du brin direct. Le complexe Pol  $\alpha$  (primase) synthétise les amorces d'ARN nécessaires à la synthèse du brin retardé (Kornberg, 1977; McMacken et al, 1977). Ces amorces sont allongées faiblement par l'ADN polymérase  $\alpha$ . Suite au chargement de la protéine PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*), Pol  $\delta$  (retardé) et Pol  $\epsilon$  (direct) deviennent processives et atteignent leur vitesse de progression maximale (1,5kb/s). Revue dans (Burgers, 2009).



**Figure 3 : vue simplifiée des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN chez les eucaryotes.**

Le complexe d'ouverture de la fourche impliquant les protéines MCM est représenté en doré, la Pol ε réplique le brin direct en vert. Pol α (primase) synthétise des amorces d'ARN qui fournissent une extrémité 3'OH pour l'élongation par pol δ. La protéine Fen1p dégrade les amorces d'ARN et une ADN ligase joint les fragments d'Okazaki. PCNA est un facteur de processivité. Adapté de (Burgers, 2009).

La fourche de réplication ne peut avancer que si la double hélice de l'ADN est ouverte en amont. Cette fonction est assurée par le complexe MCM (*Mini Chromosomal Maintenance*) qui contient des activités hélicase (Revue dans (Forsburg, 2008)). Suite à la synthèse des fragments d'Okazaki, la protéine Fen1p (Rad27p) dégrade les amorces d'ARN et la polymérase β comble les trous (Fig. 3) (Burgers, 2009). Une ADN ligase restaurera la continuité des fragments néo-synthétisés. Le processus de réplication de l'ADN par réplication semi-conservative est universel et très coûteux en énergie pour la cellule. Il a été montré qu'environ 100 000 fragments d'Okazaki sont générés lors de la phase S de *S.cerevisiae*, chaque fragment contient entre 1000 et 2000 bases (Burgers, 2009).

Le mécanisme de réplication a été présenté dans ce paragraphe de manière très générale et non-exhaustive, de nombreux autres facteurs protéiques sont requis pour assurer une réplication efficace.

Ce mode de réplication fonctionne très bien quand la molécule d'ADN à répliquer est circulaire comme c'est le cas chez les bactéries. Cependant, un problème majeur apparaît pour répliquer des molécules d'ADN linéaires comme les chromosomes eucaryotes, notamment aux extrémités de ceux-ci.

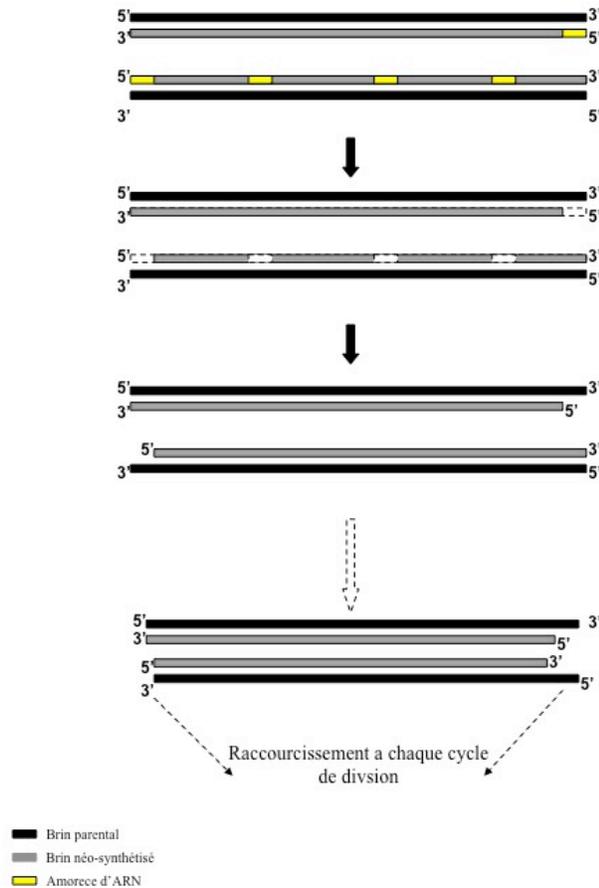
### **1.3 Problème de fin de réplication.**

En 1972, James D. Watson présentait une conférence sur la réplication du bactériophage T7 qui avait la particularité de se concaténer lors de la réplication. Il se demanda alors pourquoi ce virus avait besoin de se concaténer pour répliquer efficacement son matériel génétique. Il suggéra que la terminaison de la réplication devait entraîner la perte de matériel génétique et que pour échapper à ce problème, le virus se concaténait, assurant la réplication complète des génomes viraux au centre du multi-génome. Il parla donc de problème de fin de réplication. Au même moment, en Russie, Alexei Olovnikov attendant le train, fit un parallèle avec le mécanisme de réplication. Si le train est la machinerie de réplication qui avance en synthétisant de l'ADN, toutes les séquences présentes sous le train, au départ de celui-ci, ne seront pas répliquées.

Ces deux théories ont donc abouti au concept du problème de fin de réplication pour les extrémités d'ADN linéaires (Revue dans (Olovnikov, 1996).

Imaginons qu'une molécule circulaire d'ADN contienne une origine de réplication. La réplication commence, l'origine s'ouvre et les fourches de réplication progressent jusqu'à ce qu'elles se rejoignent, la réplication est complète. Par contre, si on se projette à la fin de la progression de la fourche de réplication sur une extrémité d'ADN linéaire, la

progression du brin direct devrait produire une extrémité à bout franc, tandis que la terminaison du brin retardé devrait fournir une extrémité cohésive, due à la dégradation de la dernière amorce d'ARN. Ce problème de fin de réplication devrait donc amener la perte de matériel génétique à chaque cycle de division cellulaire (Fig. 4).



**Figure 4 : explication simplifiée du problème de fin de réplication.**

Cette figure illustre le fait que la réplication semi conservative va entraîner la perte de matériel génétique à l'extrémité de tous les chromosomes au fur et à mesure des générations.

Si on considère que la dernière amorce d'ARN s'hybride à l'extrémité du chromosome, lors de la dégradation de cette amorce, on devrait observer une perte de

matériel correspondant à la longueur de cette amorce, c'est à dire 7 à 10 nucléotides chez la levure. Cependant, même si la perte de matériel mesurée chez la levure *S.cerevisiae* est dans le même ordre de grandeur (3 à 5 bases par génération), la perte observée dans les cellules humaines est beaucoup plus grande (100 à 500 pb par génération). Dans le but d'expliquer cette perte génétique expérimentalement, Ohki R. et coll. se sont intéressés à la réplication *in vitro* du génome du virus SV40 (Ohki et al, 2001). Ils ont pu visualiser la réplication des deux brins d'ADN et montrer pour la première fois que la réplication du brin direct est complète et produit une extrémité à bout franc tandis que la réplication du brin retardé est incomplète. La perte de matériel mesurée par cette équipe est de 200 à 500nt, ce qui est proche de la longueur d'un fragment d'Okazaki. Les auteurs suggèrent donc que la primase ne peut pas initier la synthèse du dernier fragment d'Okazaki à l'extrémité de la chaîne d'ADN et que la probabilité d'avoir élancement d'un fragment d'Okazaki à l'extrémité d'une molécule linéaire est proche de 0 (Ohki et al, 2001). Ces résultats expliquent donc les différences d'attrition observées entre les différentes espèces. Cependant, cette étude a été réalisée sur un vecteur viral SV40 qui est connu pour avoir une réplication peu efficace *in vitro*.

Le problème de fin de réplication entraîne donc la perte nette de matériel génétique à chaque division. Les bases moléculaires de ce mécanisme sont d'une part l'incapacité de la machinerie du brin retardé à répliquer complètement sa matrice linéaire et d'autre part la génération d'extrusion riche en G sur les brins néo-synthétisés (direct et retardé) aux extrémités des chromosomes (Makarov et al, 1997) (section 5.8).

#### **1.4 Conséquences du problème de fin de réplication, la sénescence répllicative.**

Avant les expériences de Hayflick, nous pensions que les cellules pouvaient se diviser indéfiniment si on leur fournissait assez de nutriments dans un environnement

contrôlé. Cependant, en 1961, Hayflick et Moorhead ont montré que des cellules humaines primaires en culture ne pouvaient se diviser qu'un certain nombre de fois *in vitro* (Hayflick & Moorhead, 1961). Cette limite est en général de trente à cinquante divisions mais cette valeur est dépendante de l'âge de l'organisme. Ce résultat suggère que les cellules possèdent une horloge interne qui leur indique combien de divisions elles pourront réaliser au cours de leur vie. Ce mécanisme limite la durée de vie répllicative des cellules et protège contre l'apparition de tumeurs, en évitant que les cellules ne deviennent immortelles (Bodnar et al, 1998; Lundblad & Szostak, 1989).

Les cellules qui atteignent la limite de Hayflick présentent des changements morphologiques et biochimiques aisément identifiables, appelés sénescence (Funayama & Ishikawa, 2007). Les cellules sénescents présentent des modifications phénotypiques, notamment une forme aplatie et un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1 (Pazolli & Stewart, 2008). Néanmoins, elles continuent d'être métaboliquement actives.

Certains types cellulaires eucaryotes simples (comme *S.cerevisiae* par exemple) peuvent se diviser indéfiniment en condition normale. Au cours du phénomène de cancérisation, les cellules cancéreuses ne présentent plus de limite de Hayflick et peuvent, de la même manière que *S.cerevisiae*, se diviser indéfiniment (Ex : cellules HeLa). Une caractéristique présente dans ces cellules est donc capable d'annuler la limite de Hayflick et ces cellules ont sûrement conservées ou réactivées un facteur qui permet de contrôler cette limite.

En reliant les hypothèse de Watson, Olovnikov et Hayflick, nous pouvons suggérer qu'il existe une relation étroite entre problème de fin de réplication et sénescence répllicative. De plus, ces deux phénomènes sont impliqués dans le mécanisme d'oncogénèse. Le problème de fin de réplication doit intervenir aux extrémités des chromosomes, qui doivent avoir des motifs ou des structures acceptant la perte de matériel génétique.

Au début des années 1930, Barbara McClintock, en collaboration avec Hermann J. Muller, travaillait sur les conséquences génétiques de l'exposition aux rayons X de

chromosomes de maïs (McClintock, 1929; McClintock, 1932; McClintock, 1938; Muller, 1928). Elle remarqua qu'après irradiation, les extrémités brisées des chromosomes étaient capables de fusionner avec d'autres extrémités brisées formant des fusions chromosomiques ou des chromosomes circulaires (McClintock, 1941). Cependant, ce type de fusion n'intervenait jamais ou très rarement sur des chromosomes normaux. Elle a donc suggéré que les extrémités des chromosomes normaux possédaient quelque chose de spécial qui était différent des extrémités générées lors de dommages à l'ADN. Elle nomma cette portion des chromosomes le télomère, du grec *telos* (la fin) et *meros* (une partie).

## **2. Structure des télomères humains.**

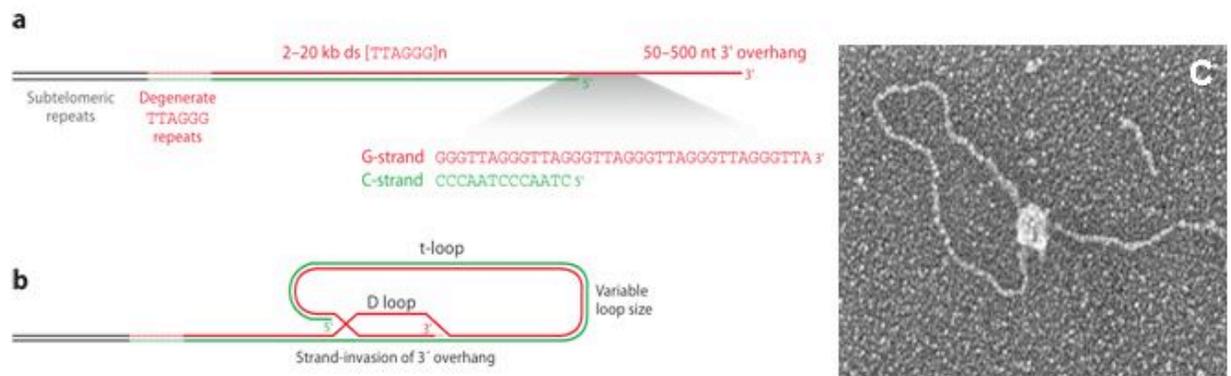
En 1978, Elizabeth Blackburn, dans le laboratoire de Joseph Gall, a pu déterminer pour la première fois une séquence télomérique chez le protiste *Tetrahymena thermophila* (Blackburn & Gall, 1978). Plus tard, les séquences télomériques ont été identifiées dans un large éventail d'organisme. Les télomères sont composés de répétitions d'ADN non codant présents chez tous les eucaryotes. Alors que les télomères humains montrent une séquence répétée stricte, d'autres organismes ont des répétitions variables, dites dégénérées. La longueur des télomères est variable et peut atteindre plusieurs dizaines de kb chez les rongeurs (Kipling & Cooke, 1990).

La séquence consensus des télomères humains, TTAGGG, va conduire à la formation d'un brin riche en guanosine et d'un brin complémentaire riche en cytosine. Afin d'éviter leur reconnaissance comme dégât à l'ADN, une longueur minimale des télomères doit être maintenue. Cette longueur est variable mais seulement treize répétitions télomériques sont suffisantes pour maintenir un télomère fonctionnel chez l'humain (Capper et al, 2007).

Plus on avance vers le centromère, plus la répétition TTAGGG va varier à cause de l'absence de pression de sélection sur ce matériel non codant. Les régions sub-téломériques contiennent différentes unités fonctionnelles, comme certains gènes et origine de réplication tardive (Raghuraman et al, 2001).

Les télomères ne sont pas des séquences se terminant en bout franc. Dans des conditions normales, le brin G est plus long que le brin C, il va donc former une extrusion simple brin en 3' aux extrémités des chromosomes. Cette extrusion peut être détectée tout au long du cycle cellulaire chez l'humain et varie de 50 à 500nt (Fig. 5A) (Makarov et al, 1997). La longueur de tractus G varie entre les espèces et va dépendre de la sensibilité du brin C aux nucléases et également du système de maintenance de la longueur des télomères.

L'extrusion d'ADN simple brin devrait être reconnue comme anormale et activer les voies de dommages à l'ADN. Néanmoins, en plus d'être liée par des protéines assurant des fonctions de protection, cette extrusion va envahir la portion double brin du télomère, entraînant la formation d'une boucle T et d'une boucle D chez l'humain (Fig. 5B) (Griffith et al, 1999). Ces boucles ont des degrés structuraux complexes, et sont notamment capables de former des structures en quadruplex G (Wang & Patel, 1993). On pourrait également supposer qu'à cause de leur haut degré structural, ce type de structure amène des problèmes lors du processus de réplication. En effet, certaines études ont montré que les fourches de réplication s'arrêtent naturellement dans les séquences télomériques humaines et chez la levure (Ivessa et al, 2002; Miller et al, 2006; Verdun & Karlseder, 2006). Beaucoup d'hélicases interviennent lors de la réplication des séquences télomériques notamment celles de la famille RecQ (WRN et BLM) (Chang et al, 2004; Crabbe et al, 2004; Shen & Loeb, 2001). Ces protéines sont importantes afin de résoudre les structures en boucle D (Opresko et al, 2004).



**Figure 5 : exemple de configuration en boucle T et boucle D observée pour les télomères humains.**

A) structure des télomères humains et séquences associées. B) conformation des télomères humain. La forme en boucle D serait nécessaire à la protection terminale des télomères mais apporterait des problèmes de résolution de structure secondaire lors du passage de la fourche de réplication. Tiré de (Palm & de Lange, 2008). C : exemple de boucle D stimulée par la présence de la protéine TRF2 en microscopie électronique. Tiré de (Griffith et al, 1999)

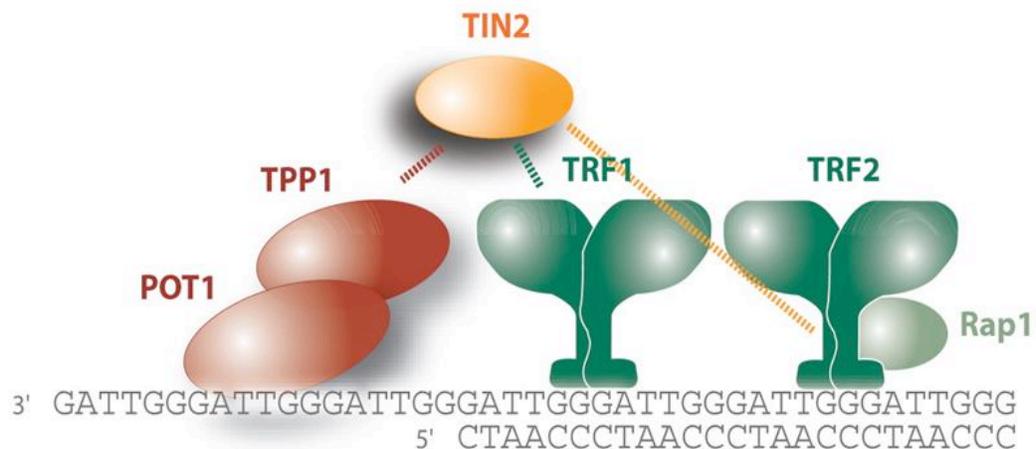
Ces structures en boucle ont été visualisées par microscopie électronique (Griffith et al, 1999). Cette architecture participe au processus d'inhibition des voies de dommage à l'ADN en masquant l'extrémité 3' libre des chromosomes.

Les séquences télomériques ne sont pas nues *in vivo* mais sont recouvertes de protéines qui assurent différentes fonctions de protection. Même si les télomères sont considérés comme des régions hétéro-chromatiniennes, ils ne possèdent pas de nucléosomes (Wright et al, 1992). En effet, les répétitions TTAGGG sont peu aptes à assembler des nucléosomes *in vitro* (Cacchione et al, 1997). Différentes protéines sont capable de lier directement ou indirectement les séquences télomériques qu'elles soient double brin ou simple brin. De récentes purifications de facteurs interagissant avec les télomères ont été réalisées et plus de 200 protéines ont été identifiées (Dejardin & Kingston, 2009). Ces résultats suggèrent que le télomère possède une composition

dynamique, mais la relation de ces différents facteurs est encore peu comprise à l'heure actuelle. Néanmoins, certaines protéines requises pour la stabilité télomérique chez l'humain ont été identifiées, notamment un complexe multi-protéique, la shelterine.

## 2.1 La shelterine recouvre les télomères humains.

Le facteur majeur de protection des télomères humains est un complexe multi-protéique composé de six sous-unités appelé shelterine (Fig. 6) (de Lange, 2005). Les protéines TRF1 et TRF2 (*Telomeric Repeat binding Factor*) sont capables de lier directement les répétitions TTAGGG. Ces deux protéines vont recruter les autres composants du complexe, TIN2 (*TRF1 Interacting Nuclear protein 2*), RAP1 (*Repressor Activator Protein 1*) et les protéines POT1 (*Protection Of Telomere 1*) et TPP1 (*TIN2 and POT1 interacting Protein 1*). Contrairement aux protéines TRF1 et TRF2, POT1 est capable de lier les répétitions télomériques simple brin, qu'elles soient libres ou au sein de la boucle T, assurant ainsi la protection de l'extrémité terminale des télomères.



**Figure 6 : représentation du complexe shelterine associé aux télomères.**

TRF1 TRF2 forment des homodimères liant les séquences télomériques. Ces protéines recrutent les autres composants du complexe : RAP1, TIN2 TPP1 et POT1. Tiré de (Palm & de Lange, 2008)

### 2.1.1 TRF1 et TRF2.

Les protéines TRF sont des protéines essentielles à la protection télomérique puisque la déplétion de ces protéines *in vivo* entraîne une forte activation des voies de dommage à l'ADN et la fusion des chromosomes. Elles sont composées de deux domaines majeurs reliés par un pont flexible (Bianchi et al, 1997; Billaud et al, 1997; Broccoli et al, 1997; Chong et al, 1995). Elles possèdent toute les deux une région C-terminale contenant un domaine *Myb* nécessaire à la liaison à l'ADN. Les domaines *Myb* de TRF1 et TRF2 sont quasi identiques et confèrent la spécificité de liaison aux répétitions télomériques (Broccoli et al, 1997). En portion N-terminale, TRF1 et 2 possèdent une séquence d'homologie TRF ainsi qu'une portion variable, riche en résidus acide pour TRF1 et basique pour TRF2 (domaine GAR). Les protéines TRF forment des homodimères ou des oligomères mais n'interagissent pas entre elles (Broccoli et al, 1997). La multimérisation des TRF augmente leur capacité de liaison à l'ADN télomérique. Comme ces protéines lient l'ADN directement, elles vont entrainer le recrutement des autres facteurs du complexe shelterine. En plus de leur rôle architectural, elles possèdent des fonctions propres.

Certaines études montrent que TRF1 possède des activités de remodelage de l'ADN (Bianchi et al, 1997; Griffith et al, 1998) et participe à la réplication des télomères (Martinez et al, 2009; Sfeir et al, 2009). De même, TRF1 est un régulateur négatif de la longueur des télomères, puisque sa surexpression induit leur raccourcissement et un mutant dominant négatif, incapable de lier l'ADN, induit leur élongation (van Steensel & de Lange, 1997)

TRF2, quant à elle, favorise l'assemblage de la boucle T et l'assemblage de la chromatine télomérique (Benetti et al, 2008; Griffith et al, 1999; Stansel et al, 2001). TRF2 participerait également à la réplication des télomères en recrutant les protéines ORC et en ouvrant la double hélice d'ADN (Amiard et al, 2007; Deng et al, 2002). Le rôle de TRF2 dans la réplication télomérique n'est cependant pas encore clair. Ces protéines sont abondantes dans les cellules et modifiées par de nombreuses modifications post traductionnelles, même si l'impact de ces modifications sur leurs fonctions reste mal compris.

### **2.1.2 RAP1.**

Par son domaine central, TRF2 va recruter la protéine RAP1, un facteur essentiel à la maintenance télomérique. RAP1 n'est pas capable de lier les séquences télomériques directement et doit obligatoirement interagir avec TRF2 pour être recrutée (interaction stœchiométrique 1:1) (Li et al, 2000).

RAP1 contient 3 domaines : un domaine *Myb* d'interaction avec un facteur protéique putatif (Hanaoka et al, 2001). Un domaine BRCF de liaison aux peptides phosphorylés et un domaine C-terminal qui interagit avec TRF2. Même si cette protéine est essentielle à la maintenance des télomères, sa fonction précise est mal comprise (Chikashige & Hiraoka, 2001; Kanoh & Ishikawa, 2001; Li & de Lange, 2003; Li et al, 2000). Des études récentes montrent que RAP1 inhibe les mécanismes de *NHEJ in vitro* comme *in vivo* (Bae & Baumann, 2007; Sarthy et al, 2009). Le *NHEJ* est un mécanisme qui entraîne la concaténation de deux fragments d'ADN double brin en cas de cassure ou de la présence de télomère courts. Ce mécanisme dépend, entre autre, de la présence des facteurs KU70/86 et de la ligase IV (Chan & Blackburn, 2003; Mieczkowski et al, 2003).

### 2.1.3 TPP1/POT1.

La protéine POT1 contient deux domaines *OB fold* nécessaires à la liaison de l'extrusion simple brin du télomère (Baumann & Cech, 2001). Les domaines *OB-fold* correspondent à un domaine de liaison aux oligonucléotides et oligosaccharides souvent utilisés lors de la liaison à l'ADN simple brin. La protéine TPP1, quant à elle, contient un seul domaine *OB fold* et peut interagir avec TIN2 grâce à son domaine C-terminal (Ye et al, 2004b). Cependant, le domaine *OB fold* de TPP1 ne semble pas interagir avec les séquences télomériques. En effet, le domaine *OB fold* de TPP1 interagit avec la télomérase, une enzyme spécialisée dans la maintenance de la longueur des télomères chez les eucaryotes (Xin et al, 2007). De plus, il a été montré que TPP1 favorise la liaison de POT1 aux télomères (Liu et al, 2004). TPP1 interagit avec la protéine POT1 sur l'ADN simple brin et fait le lien entre POT1 et les dimères TRF1 et 2.

Alors que chez l'humain et chez la levure *S.pombe*, une seule forme de POT1 a été caractérisée (Baumann & Cech, 2001), une récente expansion a conduit à l'apparition de deux copies de POT1 chez les rongeurs, POT1a et POT1b (Hockemeyer et al, 2006). Bien que ces deux protéines soient impliquées dans la maintenance télomérique et ne soient pas recrutées aux télomères lors de la mise en silence de TPP1, elles ont développé des fonctions différentes (Hockemeyer et al, 2007). En effet, il a été montré que POT1a est capable d'inhiber l'activation de la kinase ATR, alors que POT1b empêche une résection abusive du brin 5' (Hockemeyer et al, 2006). Ces deux fonctions sont retrouvées combinées dans la protéine POT1 humaine (Palm et al, 2009).

### 2.1.4 TIN2.

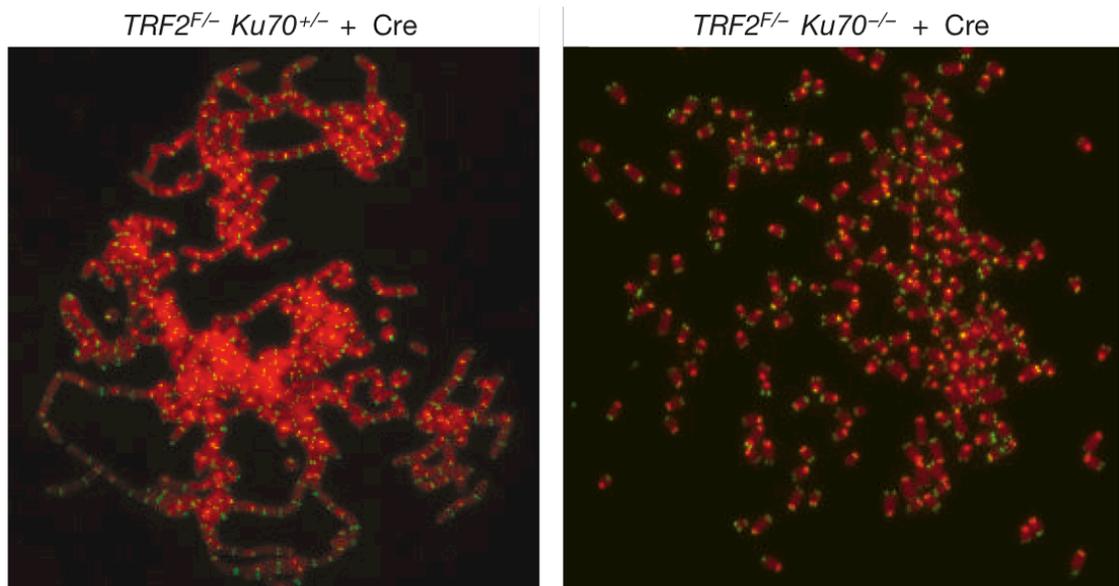
La protéine TIN2 est une protéine importante du complexe shelterine puisqu'elle est capable de lier à la fois TRF1, TRF2 et TPP1 (Kim et al, 1999). TIN2 possède trois domaines de liaison différents aux protéines TRF1, TRF2 et TPP1. Sa liaison conduit à l'interaction entre les homodimères TRF1/TRF2 et la portion simple brin du télomère, liée par TPP1/POT1 (Ye et al, 2004a). La protéine TIN2 possède un rôle architectural nécessaire à l'interaction entre les facteurs liant les régions double brin et simple brin des télomères. De ce fait, la déplétion de TIN2 a des effets dramatiques sur la stabilité de la shelterine (Ye et al, 2004a). Même si cette protéine est un composant à part entière de la shelterine, sa dynamique de liaison reste inconnue.

### **2.1.5 Facteurs accessoires de la shelterine.**

En plus de la présence du complexe shelterine, différents facteurs accessoires sont présents sur les télomères humains (Dejardin & Kingston, 2009). Certains possèdent une interaction transitoire, contrairement à la shelterine qui est associée aux télomères au cours du cycle cellulaire. Différentes catégories de facteurs sont associés aux télomères, notamment des facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN (protéines ORC, hélicases de la famille RecQ) (Deng et al, 2007; Opresko et al, 2004), la réponse aux dommages à l'ADN (KU70/86, MRE11, RAD50, Apollo)(Hsu et al, 1999; Hsu et al, 2000; Lenain et al, 2006; Zhu et al, 2000) et la structure de la chromatine (protéine HP1)(Garcia-Cao et al, 2004). Il est intéressant de noter que, de façon paradoxale, les télomères inhibent l'activation des voies de dommage à l'ADN mais recrutent pourtant des facteurs majeurs de celles-ci (MRE11 par exemple). Même si les facteurs recrutant ces protéines sont connus, leur fonction sur la maintenance télomérique reste mal comprise.

## 2.2 Fonctions associées à la shelterine.

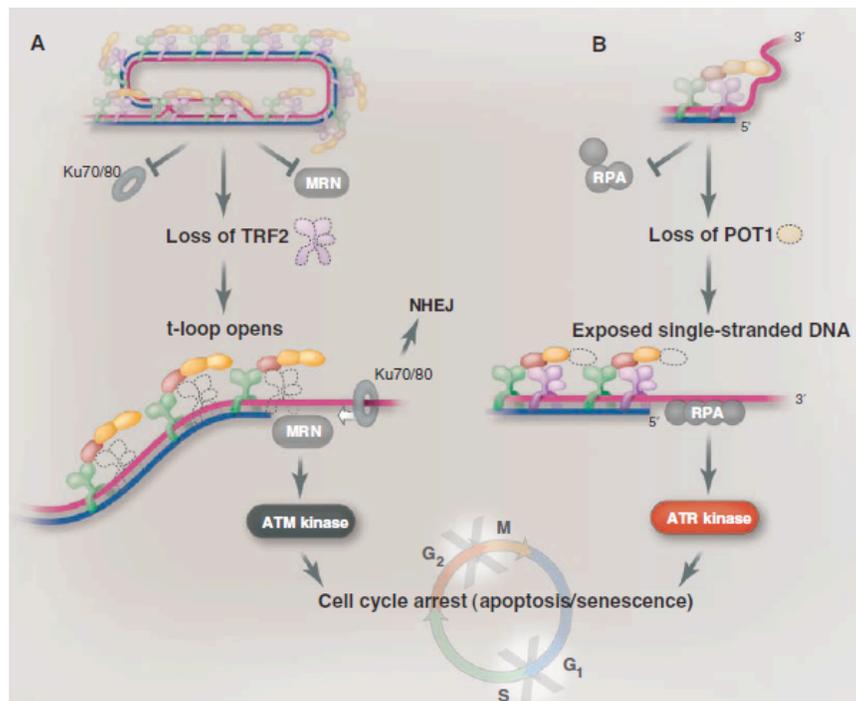
La shelterine recouvre donc les séquences télomériques et participe à la protection des télomères. Dans le cas de déplétion de TRF2 ou de POT1, les cellules stoppent leur progression dans le cycle cellulaire à cause de l'activation des points de contrôle dépendants de ATM et ATR, respectivement (Celli & de Lange, 2005; Denchi & de Lange, 2007). L'activation d'ATM est préférentielle aux cassures double brin où elle va être recrutée sur la cassure par le complexe MRN (MRE11, RAD50, NBS1) et entraîner la phosphorylation de toute une batterie d'effecteurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Chk1, p53) (Shiloh, 2003). Comme TRF2 lie préférentiellement la portion la plus distale de la portion double brin du télomère, il est possible que cette portion soit reconnue comme une cassure double brin. TRF2 empêcherait donc l'activation d'ATM et la fusion des chromosomes par *NHEJ* (Fig. 7,8).



**Figure 7 : exemple de fusion chromosomique induite par la perte de fonction télomérique.**

Un étalement chromosomique incapable de fusionner est montré à droite (Ku70<sup>-/-</sup>). A gauche, la présence du facteur Ku70 induit la concaténation des chromosomes par défaut de protection des télomères (Trf2<sup>F/-</sup>), appelé « plat de spaghetti ». (Rouge, ADN ; vert, télomères). Tiré de (Celli et al, 2006)

La déplétion de POT1 va, à l'inverse, entrainer l'activation d'ATR (Denchi & de Lange, 2007). ATR est une kinase recrutée par la protéine RPA. Cette dernière est une protéine de liaison à l'ADN simple brin normalement présente au sein de la fourche de réplication. L'association stable de RPA à un fragment d'ADN simple brin s'accompagne du recrutement d'ATR par son partenaire ATRIP. L'activation d'ATR conduira à la phosphorylation d'effecteurs dont certains sont communs avec ATM. La fonction de POT1 repose donc sur le masquage de l'extrusion 3' des télomères. Si la concentration intracellulaire en POT1 baisse, RPA va prendre la place de POT1 sur l'extrusion 3' télomérique et activer les voies de dommage à l'ADN (Denchi & de Lange, 2007).



**Figure 8 : la perte de protection des télomères s'accompagne d'une activation des voies de dommage à l'ADN.**

A) la perte de fonction de TRF2 entraîne l'activation de la voie ATM, conduisant à la réparation par *NHEJ* (voir Fig. 7). B) la perte de POT1 active la voie ATR dépendante. Les deux voies conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire. Tiré de (de Lange, 2009)

Nous avons vu dans cette partie que les télomères sont des structures nucléoprotéiques qui empêchent la perte de matériel génétique codant dû au problème de fin de réplication. De plus, leur deuxième fonction essentielle réside dans l'inhibition de l'activation des voies de dommage à l'ADN dépendant de ATM et ATR (Fig. 8), qui conduirait à la fusion des chromosomes entre eux. Les télomères représentent également une horloge moléculaire qui indique aux cellules combien de divisions elles pourront réaliser au cours de leur vie. Chez l'humain, la longueur des télomères dans les cellules somatiques est raccourcie par rapport notamment à ceux de la lignée germinale, qui maintiennent une longueur normale en utilisant un système enzymatique spécialisée, la télomérase.

### **3. Structure de la télomérase humaine.**

#### **3.1 Historique.**

La découverte de la télomérase est le fruit d'une collaboration entre les laboratoires des Dr Jack Szostak et Elizabeth Blackburn. Le Dr Szostak s'était intéressé à la conception de chromosomes artificiels chez la levure *S.cerevisiae*. Le Dr Szostak avait construit un plasmide linéaire qui contenait aux extrémités les séquences télomériques de *Tetrahymena*

*thermophila* (clonés chez le Dr Blackburn) (Szostak & Blackburn, 1982). Ils ont pu montrer que la présence des séquences télomériques de *Tetrahymena* était essentielle pour la maintenance de cette construction au fur et à mesure des générations, chez la levure. Cette complémentarité trans-espèce souligne le fait que la fonction des télomères est conservée au cours de l'évolution.

Par la suite, une extrémité de ce chromosome linéaire a été remplacée par un fragment aléatoire du génome de *S.cerevisiae*. En cherchant quelles séquences étaient capables de maintenir cet ADN linéaire au cours des générations, le Dr Szostak a pu cloner pour la première fois le télomère de *S.cerevisiae* (Szostak & Blackburn, 1982). Cependant, les auteurs ont remarqué quelque chose de particulier. Les télomères de *Tetrahymena* clonés dans cette construction avaient la caractéristique de maintenir cette construction au cours des générations, cependant, fait très surprenant, ils étaient allongés de façon très spécifique. Suite à ce résultat, il a été postulé que les télomères étaient allongés par recombinaison, mais les Dr Greider, Szostak et Blackburn pensaient à une nouvelle activité enzymatique (Lundblad, 2006). La « chasse » à l'enzyme a donc été ouverte, d'un point de vue biochimique dans le laboratoire de Blackburn (étude réalisée par Carol Greider) et d'un point de vue génétique dans le laboratoire de Szostak (réalisée par Vicky Lundblad) (Lundblad, 2006).

En criblant des mutants incapables de conserver le phénotype d'élongation des télomères, l'équipe du Dr Szostak a découvert le gène *EST1* (*Ever Shorter Telomere*) comme étant requis pour l'activité terminal transférase (Lundblad & Szostak, 1989). En parallèle, l'équipe du Dr Blackburn a découvert en 1985, une nouvelle activité enzymatique dans des extraits cellulaires de *Tetrahymena* capable d'allonger des amorces télomériques (Greider & Blackburn, 1985). Cette nouvelle enzyme a été nommée télomère terminale transférase et serait responsable de la maintenance de la longueur des télomères au cours des divisions. Par la suite, Carol Greider a découvert que cette terminale transférase était en fait un complexe ribonucléoprotéique où à la fois des composants ARN et protéiques sont essentiels à l'activité terminal transférase (Greider & Blackburn, 1987; Greider &

Blackburn, 1989). Plus tard, la terminale transférase spécifique aux télomères a été renommée télomérase. Les Dr Szostak, Blackburn et Greider ont reçu le prix Nobel de Médecine 2009 pour cette découverte. L'obtention de ce prix démontre bien l'importance actuelle des travaux impliquant la compréhension de la régulation de l'activité télomérase, notamment du point de vue du développement tumoral.

### **3.2 Structure de la télomérase humaine active.**

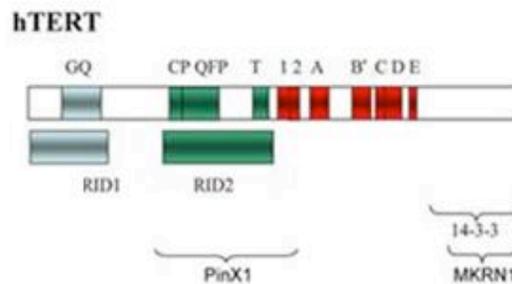
L'activité télomérase humaine est détectée uniquement dans les cellules en forte prolifération chez l'adulte mais également lors du développement embryonnaire, où elle maintient le potentiel réplicatif des cellules (Cong et al, 2002; Janknecht, 2004). Cette enzyme est un complexe ribonucléoprotéique composé d'un ARN, *hTR* (aussi appelé *TERC*, *TElomerase RNA Component*) qui est utilisé comme matrice pour l'addition de répétitions télomériques par la sous unité catalytique hTERT (*Human TElomerase Reverse Transcriptase*). L'appariement de la matrice de *hTR* avec l'extrusion simple brin riche en G du télomère entraîne l'alignement de la télomérase et l'addition de nucléotides. La télomérase possède une processivité intrinsèque, correspondant au nombre de nucléotides ajoutés pendant un tour d'élongation, et extrinsèque, correspondant au nombre de cycles d'initiation/élongation réalisés en un seul évènement d'élongation télomérique.

Alors que l'expression de *hTR* est ubiquitaire et nécessaire à la prolifération cellulaire (Feng et al, 1995), l'expression de la sous unité catalytique hTERT est réprimée dans les cellules somatiques (Cong et al, 2002; Janknecht, 2004). La réexpression de hTERT est suffisante pour augmenter les capacités prolifératives des cellules humaines, une des caractéristiques principales des cellules pré-tumorales (Bodnar et al, 1998). La purification de complexes télomérase actifs dans des cellules cancéreuses a permis l'identification des facteurs minima requis pour obtenir une activité catalytique (Cohen et

al, 2007). Ces facteurs sont bien évidemment hTERT, *hTR* et une protéine impliquée dans la modification des ARN non-codants, la dyskérine.

### 3.2.1 La sous-unité catalytique hTERT.

La protéine hTERT contient plusieurs domaines conservés par la superfamille des rétro-transcriptases (RT) (Fig. 9) (Autexier & Lue, 2006). Contrairement aux autres RT, elle transporte sa propre matrice d'ARN (*hTR*) et elle n'utilise qu'une petite portion de celle-ci. Dans son domaine central, hTERT contient sept domaines RT responsables de l'activité catalytique.



**Figure 9 : différents motifs sont présents dans hTERT.**

Les différents domaines de hTERT sont présents. Régions 1-E (rouge) : motifs rétro-transcriptases, RID : *RNA interacting domain*. Tiré de (Moon & Jarstfer, 2007)

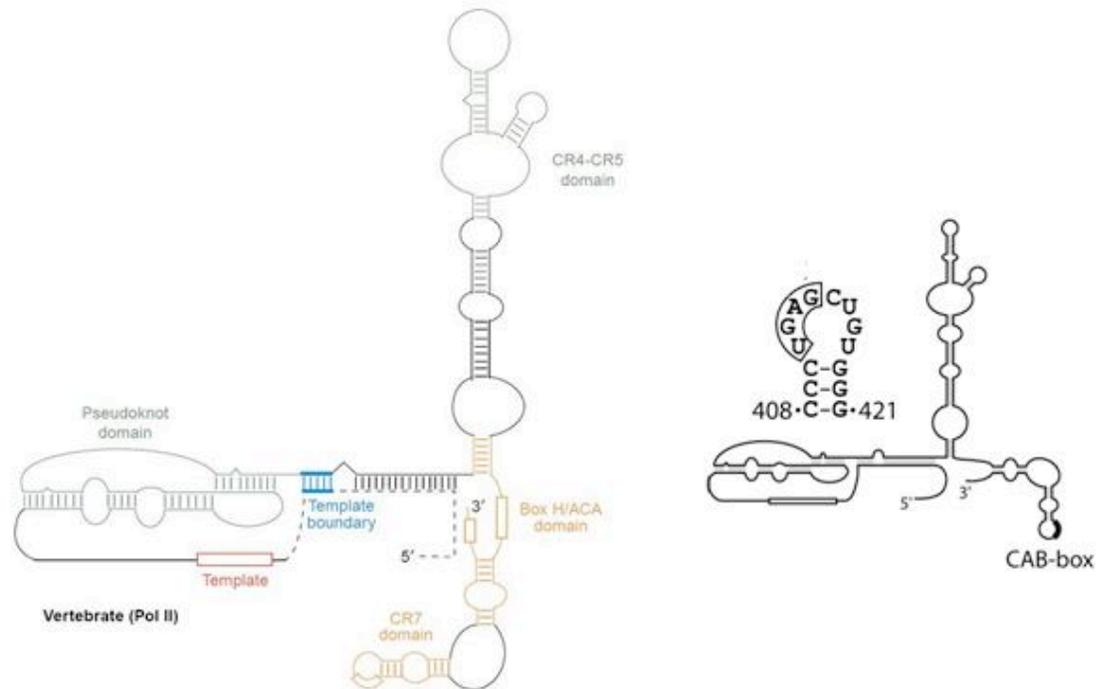
La partie N-terminale d'hTERT contient les sites de liaison au composant ARN de la télomérase, RID1 et RID2 (*RNA Interacting Domain*). Comme il existe des variations de séquences entre les ARN télomériques en fonction des espèces, la partie 5' de TERT est divergente. Elle contient également un domaine N-terminal de 400AA et C-terminal de 150 à 200AA, qui sont lieu d'interactions protéine-protéine, même si certaines TERT ne possèdent plus cette partie (cTERT de *C.elegans*) (Malik et al, 2000). En plus de lier le composant ARN de la télomérase, la portion N-terminale de hTERT lie différentes

protéines, notamment PINX1. La protéine PINX1 apparaît comme un régulateur négatif de la télomérase puisque sa surexpression entraîne un raccourcissement des télomères. PINX1 inhibe la télomérase en liant à la fois hTERT et *hTR in vivo* (Banik & Counter, 2004). La liaison de PINX1 pour le contrôle de l'activité télomérase est déjà présente chez *S.cerevisiae* (Lin & Blackburn, 2004)

La portion C-terminale lie différents facteurs protéiques impliqués dans le contrôle de son accumulation et de sa localisation intracellulaire, en liant l'ubiquitine ligase MKRN1 et la protéine 14-3-3, respectivement. Il a été montré que 14-3-3 est requise pour la localisation nucléaire de hTERT, en inhibant la liaison de hTERT avec CRM1, un adaptateur de l'export nucléaire (Seimiya et al, 2000). De ce fait 14-3-3 est essentielle à l'accumulation nucléaire de la télomérase humaine. L'ubiquitine ligase MKRN1, quant à elle, contrôle l'accumulation cellulaire d'hTERT en ciblant sa dégradation par le protéasome (Kim et al, 2005).

### **3.2.2 L'ARN *hTR*.**

L'expression de *hTR* est constitutive et nécessaire à la prolifération cellulaire (Feng et al, 1995). *hTR* est un ARN non-codant de 451nt transcrit par l'ARN polymérase II. Il sera donc coiffé et poly-adénylé comme un ARNm. Cependant, la forme mature contient une coiffe tri-méthylée et est polyA- (Boulon et al, 2004). La structure secondaire de cet ARN a été déterminée par étude phylogénétique chez les vertébrés (Fig. 10).



**Figure 10 : structure de l'ARN *hTR* et séquence de la boîte CAB.**

A gauche, les différentes régions essentielles à la fonction d'*hTR* sont représentées. Adapté de (Chen & Greider, 2004). A droite, position et séquence de la CAB box dans la boucle CR7, tiré de (Cristofari et al, 2007).

*hTR* contient quatre éléments structuraux conservés : le pseudo-nœud, la boucle CR7 (*Conserved Region 7*), les régions CR4-CR5 et le domaine H/ACA. Malgré le manque de conservation de séquence, le pseudo-nœud est présent dans l'ARN de la télomérase des ciliés jusqu'aux mammifères. La portion 5' d'*hTR*, contenant le pseudo-nœud et la région CR4-CR5, sont requises pour l'activité catalytique (Tesmer et al, 1999). Le domaine en pseudo-nœud correspond au site putatif de liaison à hTERT et inclus la matrice de rétro-transcription (11nt, 5'-CUAACCCUAAC) (Feng et al, 1995). La rétro-transcription de *hTR* est limitée par la présence d'une barrière, une structure en tige qui empêche la rétro-transcription complète de cet ARN. Des mutations dans le pseudo-nœud abolissent complètement l'activité télomérase. La boucle CR4-CR5 est capable également de lier

hTERT. Des mutations altérant la formation des tiges boucles dans le domaine CR4-CR5 inhibent l'activité télomérase *in vitro* comme *in vivo* (Chen et al, 2002; Martin-Rivera & Blasco, 2001; Mitchell & Collins, 2000). Les régions en 3', la boucle CR7 et le domaine H/ACA sont requises pour la stabilité de l'ARN (Mitchell et al, 1999a; Mitchell et al, 1999b). La portion 3' de *hTR* est également nécessaire à sa rétention nucléaire, puisque des mutants de cette portion entraîne une accumulation cytoplasmique de cet ARN (Lukowiak et al, 2001).

*hTR* contient des caractéristiques spécifiques à une classe spécialisée de petits ARN, les scaARN. En effet, les équipes des Dr Kiss et Feigon ont identifié plusieurs motifs sur la séquence de *hTR* caractéristiques de scaARN (*Small Cajal body associated RNA*) (Theimer et al, 2007). Les scaARN sont des petits ARN localisés dans les corps de Cajal qui guident les modifications post transcriptionnelles des petits ARN nucléaires (Darzacq et al, 2002; Kiss et al, 2002). Ce sont en général des ARN hybrides entre snoARN à boîte C/D et snoARN à boîte H/ACA. En étudiant la séquence d'*hTR*, les auteurs ont pu identifier une boîte appelée CAB, dans la boucle CR7 de *hTR*, proche du domaine H/ACA. Cette boîte s'est retrouvée présente dans différents scaARN, suggérant le fait que l'ARN de la télomérase et les scaARN partageraient des caractéristiques communes.

### 3.2.3 La dyskérine.

Comme tous les ARN contenant des boîtes H/ACA, *hTR* lie les protéines NOP10, NHP2, GAR1 et la dyskérine. La dyskérine est une pseudo-uridylyl synthase impliquée dans la fonction des snoARN à boîte H/ACA, homologue de la protéine Cbf5p de levure (Meier & Blobel, 1994). L'activité catalytique de la dyskérine repose sur la pseudo-uridylation de résidus uracile présents dans les ARN, par l'intermédiaire d'ARN guides. Même si il n'y a pas d'indication montrant que *hTR* pourrait entraîner la modification post-transcriptionnelle d'autres ARN, la présence de la dyskérine est requise pour sa stabilité. Des mutations dans

la dyskérine, ou dans la région de *hTR* liant cette protéine, conduisent à l'apparition d'une maladie, la *dyskeratosis congenita* (DC) (Errington et al, 2008; Heiss et al, 1998; Mitchell et al, 1999b; Robart & Collins, 2010). Elle se traduit par des défauts de développement de la moelle osseuse, des appareils génitaux atrophiés et la prédisposition à certains cancers (Vulliamy et al, 2001). De plus, cette maladie s'accompagne d'un syndrome progérique, qui se traduit par un vieillissement prématuré des tissus. En général, les syndromes progériques sont en relation avec une maintenance défectueuse des télomères, puisque les patients atteints de progéria ont des télomères beaucoup plus courts que la normale (DC, Syndrome de Bloom, Werner, etc.). En effet, certaines mutations retrouvées dans la DC s'accompagnent d'une forte diminution de l'activité télomérase (Cerone et al, 2005; Robart & Collins, 2010). La fonction de protection de l'extrémité 3' est donc essentielle à l'activité et la dyskérine fait partie des complexes télomérase (Cohen et al, 2007). De plus, différentes études suggèrent que le domaine CR7 (contenant la boîte CAB) et H/ACA contrôlent la localisation intracellulaire de *hTR*. Ce domaine CAB est lié par une protéine, WDR79, responsable du ciblage de *hTR* vers les corps de Cajal (Venteicher et al, 2009). Un défaut de ciblage intranucléaire entraîne des défauts dans la maintenance des télomères (Cristofari et al, 2007) (voir section 5.8).

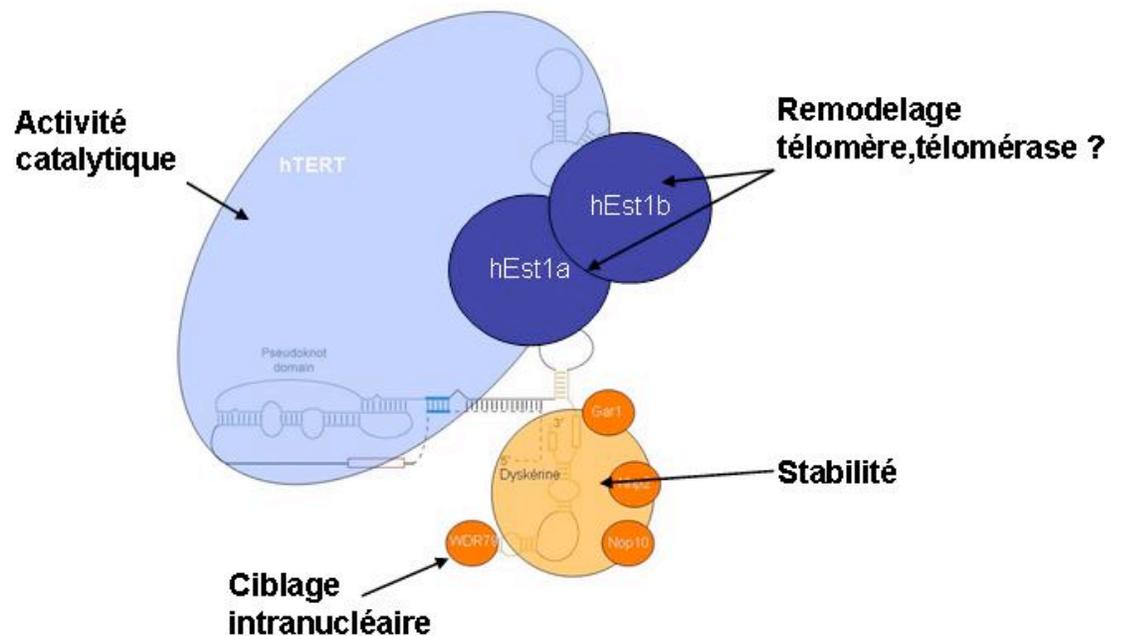
### 3.2.4 hEST1.

En plus de l'association de hTERT et de la dyskérine avec *hTR*, la télomérase humaine va lier les protéines hEST1. Il existe trois isoformes chez l'humain (hEST1a, b, c) qui ont été identifiées par homologie avec la protéine Est1p de levure (Reichenbach et al, 2003). Même si la fonction de la protéine Est1p est bien caractérisée, ses équivalents humains ont des fonctions encore peu étudiées.

hEST1a est associée avec la télomérase *in vivo* et lie à la fois *hTR* et la protéine hTERT (Redon et al, 2007). Sa surexpression entraîne la fusion des chromosomes de façon

indépendante de la perte de fonction de TRF2 (Reichenbach et al, 2003; Snow et al, 2003). Ce résultat suggère qu'hEST1a est un facteur remodelant le télomère afin de le rendre compétent pour l'action de la télomérase.

hEST1b semble également être associée avec l'activité télomérase et interagit avec différentes chaperonnes en relation avec la télomérase, comme HSP70 et 90. hEST1b pourrait donc être impliquée dans la biogénèse de la télomérase ou dans sa maturation (Lee et al, 2006). Alors que les fonctions des variants a et b de hEST1 sont en cours d'étude, hEST1c a une fonction inconnue.



**Figure 11 : schéma du complexe télomérase chez l'humain.**

Les protéines associées, leur fonction et leur site de liaison sont résumés.

En conclusion, l'activité télomérase humaine dépend de l'association et de la coopération étroite entre son composant ARN, *hTR*, qui porte la matrice et sert de squelette pour l'assemblage des protéines du complexe (Fig. 11). La présence d'hTERT est

nécessaire à l'activité catalytique, et il apparaît que les protéines hEST1 sont nécessaires à l'intégration de la télomérase avec son substrat. La dyskérine et ses facteurs associés, s'associent sur le domaine H/ACA de *hTR* et sont responsables de sa stabilité et de son trafic.

### **3.3 La télomérase au centre du processus de formation des tumeurs.**

La télomérase et la maintenance télomérique sont des cibles de choix pour les thérapies anticancéreuses de par leur universalité (Harley, 2008). En effet, l'apparition de tumeurs nécessite l'activation d'un oncogène et la perte d'un suppresseur de tumeur. Hors, ces facteurs peuvent être de nature très différentes en fonction des types de cancers (ex : BRCA1, *Ras*, *Myc*, p53, Rb etc.). La maintenance de la longueur des télomères est un processus universel et absolument requis pour la progression tumorale. On estime que plus de 85% des tumeurs réactivent la télomérase, c'est à dire, l'expression d'hTERT et beaucoup de suppresseurs de tumeurs inhibent son expression *in vivo* (Lin & Elledge, 2003). Si la télomérase n'est pas réactivée, les cellules utilisent une voie alternative de maintenance de la longueur des télomères, l'ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) (Janknecht, 2004). Encore aujourd'hui, le ciblage de la maintenance télomérique en thérapie anticancéreuse reste l'outil le plus prometteur pour lutter contre l'apparition et la progression des tumeurs.

Même si les composants enzymatiques de cette enzyme sont caractérisés chez l'humain, certains points comme la régulation de sa biogénèse et de son assemblage reste encore mal compris. De plus, plusieurs points clés restent obscurs, notamment comment la longueur des télomères est régulée chez l'humain et comment la télomérase est recrutée sur son substrat. Le développement de différents systèmes modèles pour l'étude de cette

enzyme a pu amener de nouvelles réponses à ces questions, notamment l'utilisation de la levure *S.cerevisiæ*, qui en fait un modèle de choix dans cette étude.

#### **4. *S.cerevisiæ* comme modèle d'étude de la télomérase.**

La levure est l'organisme originel de l'étude des télomères et de la télomérase. Son implication dans la recherche sur la maintenance de la stabilité génétique est énorme à cause de différents atouts.

Premièrement, la levure est un organisme simple, dont le génome est totalement séquencé et la culture peu onéreuse. Sa croissance rapide permet la production de nombreuses cellules en un court laps de temps qui peuvent être utilisées pour des études biochimiques. La disposition d'outils génétiques très puissants, comme la recombinaison homologue, autorise la délétion rapide et efficace de gènes, contrairement à la mise en silence par ARN interférents dans les cellules humaines qui est souvent partielle et apporte des problèmes de spécificité.

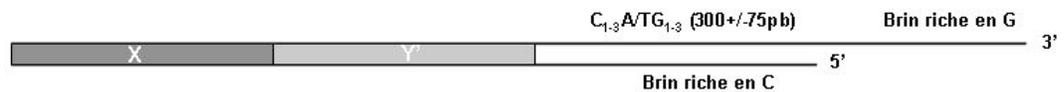
Deuxièmement, la levure a un avantage tout particulier dans l'étude de la télomérase puisqu'elle l'exprime de façon constitutive, contrairement à la plupart des cellules somatiques humaines. L'utilisation de cellules humaines pour étudier la télomérase est plus difficile. En effet, ce sont des cellules fragiles qui poussent lentement et qui ne disposent pas d'outils génétiques.

Finalement, les grandes fonctions cellulaires sont en général conservées au cours de l'évolution, ce qui suggère que des facteurs ayant un rôle majeur chez la levure auront un rôle similaire chez les mammifères. Les complexes télomérasiques de levure et d'humains ont des structures similaires (Smogorzewska & de Lange, 2004).

## 5. Structures et fonctions des télomères de *S.cerevisiae*.

Nous avons décrit précédemment la composition des télomères humains avec l'importance de la shelterine dans la protection des télomères. Toutes les fonctions de protections présentes chez l'humain sont aussi présentes chez la levure.

De la même manière que les télomères humains, ceux de *S.cerevisiae* sont composés de répétitions télomériques double brin d'une longueur d'environ 300pb $\pm$ 75 en condition normale. Contrairement aux répétitions télomériques humaines TTAGGG, les répétitions télomériques de *S.cerevisiae* sont dégénérées (TG<sub>1-3</sub>).

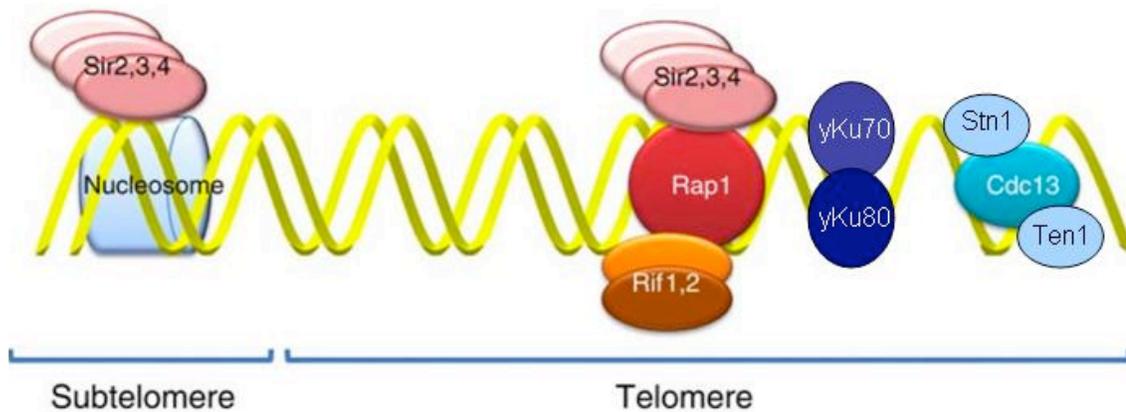


**Figure 12 : schéma simplifiée de la structure télomérique chez *S.cerevisiae*.**

A la suite des répétitions télomériques, vers le centromère, on trouve différentes séquences répétitives d'ADN. Chez la levure, deux régions répétées sont majoritaires dans les régions sous-télomériques, appelées X et Y' (Fig. 12). L'élément Y' existe en deux longueurs majeures, 5,2 et 6,7kb, et est présent seulement dans une sous population de télomères (Zakian & Blanton, 1988). L'élément X est hétérogène allant de 0,3 à 3kb et la plupart des télomères possèdent cet élément. Ces structures sont dynamiques en expansion et rétraction par recombinaison homologe (Louis & Haber, 1990a; Louis & Haber, 1990b; Louis & Haber, 1992). La portion X est également un lieu d'expansion puisqu'il a été montré que le rétro-transposons *Ty5*, de la famille *copia*, s'insère à proximité (Zou et al,

1995). Les séquences X et Y' ne sont pas télomériques et sont donc recouvertes de nucléosome. Les régions X et Y' participent activement à la réplication des télomères puisqu'elle contiennent les dernières ARS responsables de la réplication des extrémités des chromosomes (Poloumienko et al, 2001; Stevenson & Gottschling, 1999). Dans cette région sub-télomériques, la densité d'ORF est faible. Néanmoins certaines familles de gènes sont présentes proches des télomères, comme les familles *SUC*, *MAL*, *MEL* et *FLO* (Teunissen & Steensma, 1995; Teunissen et al, 1995).

La portion double brin des télomères va être protégée par la liaison de la protéine Rap1p. Rap1p interagit avec deux classes de facteurs, le complexe Rif1p/Rif2p et le complexe Sir2/3/4p (Fig. 13). Rap1p assure chez la levure les fonctions du complexe TRF1/TRF2 chez l'humain. La fonction de POT1 va être assurée par le complexe CST (Cdc13p, Stn1p, Ten1p). Un dernier facteur, le complexe yKu70/80p est également nécessaire à la maintenance des télomères.



**Figure 13 : Schéma simplifié des facteurs présents en position télomérique et sub-télomérique.**

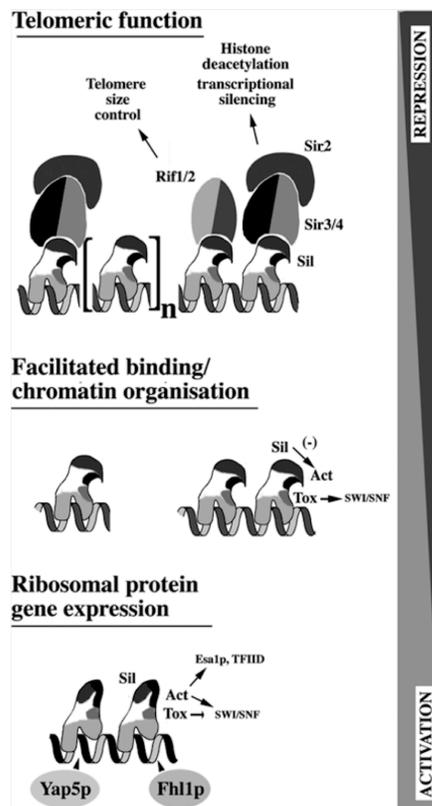
Cdc13p, en complexe avec les protéines Stn1p et Ten1p, lie l'ADN simple brin et coiffe l'extrémité terminale du télomère. Le complexe Sir induit la répression transcriptionnelle.

Rif1p et Rif2p interagissent avec Rap1p pour contrôler la longueur des télomères. yKu70p/80p lie la portion double brin télomérique et a des fonctions pleïotropiques. Adapté de (Liew & Norbury, 2009)

## 5.1 Rap1p.

La portion distale double brin du télomère va être recouverte par la protéine Rap1p (Gilson et al, 1993). Cette protéine est un facteur de transcription qui assure des fonctions diverses et même contradictoires au sein des cellules (Fig. 14). Elle a été originellement identifiée comme régulateur positif de la transcription de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, notamment certains gènes codant pour des protéines ribosomiques (Huet et al, 1985). Par la suite, Rap1p a été identifié comme le facteur majeur de liaison à l'ADN télomérique double brin, essentiel pour la maintenance de la longueur des télomères et de leur intégrité structurelle (Berman et al, 1986; Conrad et al, 1990). Des expériences d'immunolocalisation ont montré que Rap1p se retrouve aux extrémités des chromosomes méiotiques et qu'en interphase, elle se retrouve en regroupement à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, là où sont situés les télomères (Klein et al, 1992; Palladino et al, 1993). De ce fait, Rap1p est utilisé comme marqueur de la position des télomères *in situ* comme *in vivo*.

Finalement, Rap1p a été impliquée dans la mise en silence de gènes notamment les loci *MAT*, *HML* et *HMR* (Buchman et al, 1988). RAP1 humain et celui de *S.pombe* sont également essentiels à la maintenance télomérique, néanmoins contrairement à Rap1p de *S.cerevisiae*, ils ne lient pas l'ADN directement.



**Figure 14 : description des rôles différents de Rap1p dans la répression et l'activation de la transcription.**

Rap1p a des fonctions différentes en fonction du contexte chromatinien et peut à la fois induire l'expression de gènes (ex : gènes codant les protéines ribosomiques) ou induire la répression transcriptionnelle (ex : télomères). Tiré de (Pina et al, 2003)

Supposément à cause de son implication dans le mécanisme de transcription des gènes codant pour les protéines ribosomales, la présence de *RAP1* est essentielle à la viabilité (Pardo & Marcand, 2005). La fonction de Rap1p est essentielle à la protection des télomères. En effet, une étude du laboratoire du Dr Marcand a montré, par l'utilisation d'une forme conditionnelle de Rap1p (Degron), que cette protéine empêche la fusion des télomères par *NHEJ* et fournit des explications sur le mécanisme de fusion induit par la présence de télomères courts (Pardo & Marcand, 2005).

Rap1p lie l'ADN télomérique tous les 18pb sur le motif 5'-ACACCCACACCAC-3' retrouvé dans les séquences télomériques (Gilson et al, 1993). Dans le cas de télomères courts possédant entre cinq et huit sites de liaison à Rap1p, les télomères ne fusionnent pas et restent stables, suggérant que seulement cinq molécules de Rap1p sont suffisantes pour inhiber la fusion télomère-télomère (Pardo & Marcand, 2005). Néanmoins, une étude de Chan et Blackburn a montré que les télomères fusionnent quand leur longueur devient critique (33pb, deux sites de liaison) (Chan & Blackburn, 2003). Ce résultat suggère que seulement trois molécules de Rap1p associées aux télomères sont suffisantes pour inhiber la fusion par *NHEJ*.

Rap1p est une protéine de 120Kda composée d'un domaine N-terminal (BRCT) qui est possiblement un domaine d'interaction protéine-protéine (Shore & Nasmyth, 1987). Son domaine central contient deux domaines Myb responsables de sa liaison à l'ADN (AA330-600) (un seul domaine est présent dans RAP1 humain) (Henry et al, 1990). Le domaine d'activation de la transcription est compris dans la région 630-692 (Hardy et al, 1992a; Hardy et al, 1992b). Le domaine de répression transcriptionnelle est compris dans la région 667-827 (Buck & Shore, 1995). Au niveau de l'extrémité C-terminale on retrouve une structure en hélice  $\alpha$  responsable de l'interaction avec ses partenaires: le complexe Rif et le complexe Sir (Feeseer & Wolberger, 2008). Par son interaction avec le complexe Sir2/3/4p et Rif1p/Rif2p, Rap1p possède des fonctions pleïotropiques au sein des cellules. Le complexe Sir est responsable de la mise en silence des télomères. Une autre fonction essentielle de Rap1p repose sur la régulation de la longueur des télomères, par l'intermédiaire du complexe Rif. En effet Marcand et coll., en 1999, ont remarqué que l'ancrage de Rap1p près d'un télomère induit son raccourcissement. Cet effet s'est avéré proportionnel au nombre de protéines Rap1p ancrées sur ce télomère. Cette information suggère que le nombre de molécules de Rap1p contrôle la longueur des télomères *in vivo* (Marcand et al, 1999).

Une étude par double hybride a montré que Sir3p interagit avec la même région que Rif1p sur la portion C-terminale de Rap1p. Ce résultat suggère qu'il existe une compétition *in vivo* entre le complexe Sir et Rif pour la liaison de l'extrémité C-terminale de Rap1p (Moretti et al, 1994).

## 5.2 Le complexe Sir2/3/4p.

Le complexe Sir2/3/4p a été identifié chez la levure comme étant requis pour la mise en silence de certains loci chromosomiques, notamment des loci *MAT*, des télomères et du locus d'ADNr (Gottschling et al, 1990; Moretti et al, 1994; Smith & Boeke, 1997). Alors que Sir3p et Sir4p divergent, Sir2p est bien conservée des archées jusqu'aux mammifères (Brachmann et al, 1995). L'homologue humain de Sir2p est appelé SIRT1 et est également responsable de la mise en silence de régions génomiques et a une relation génétique avec la maintenance télomérique. En effet, la surexpression de SIRT1 induit l'expression de hTERT (Starai et al, 2002).

Bien que *SIR2* ne soit pas essentiel, sa délétion s'accompagne d'une perte complète de la mise en silence des gènes, d'une augmentation de la recombinaison des unités d'ADNr et d'une baisse de la stabilité des chromosomes.

La protéine Sir2p est une histone déacetylase NAD<sup>+</sup> dépendante qui va entraîner la désacétylation des histones H3 et H4 au sein de la chromatine (Imai et al, 2000). Le complexe Sir n'est pas capable de lier l'ADN directement. L'ancrage de Sir2p aux télomères par la protéine Rap1p va induire la désacétylation des histones en amont de Rap1p, vers le centromère. La désacétylation des histones entraîne la compaction de la chromatine, empêchant la transcription. Dans des essais de puces à grande échelle étudiant l'acétylation des histones, Robyr et coll. ont montré qu'une délétion de Sir2p s'accompagne de l'hyperacétylation des histones en position sub-télomérique (Robyr et al, 2002). On peut conclure de ces expériences que la liaison de Rap1p et la liaison de Sir2p aux télomères

entraîne la mise en silence des régions subtélomériques, un phénomène appelé TPE (*Telomere Position Effect*). Le TPE s'étend sur 2 à 4kb à partir des télomères (Renauld et al, 1993).

Alors que Sir2p contient l'activité catalytique, Sir3p et 4p sont des protéines architecturales. Sir3p est capable de se retrouver sur les régions télomériques et interagit avec Rap1p (Hecht et al, 1996). Sir4p peut interagir avec Rap1p et les histones d'une façon Sir3 dépendante et une étude a proposé que cette protéine est impliquée dans la maintenance de la mise en silence plutôt que dans sa nucléation (Moretti et al, 1994).

### **5.3 Le complexe Rif1p/Rif2p.**

La découverte des protéines Rif (*Rap1 Interacting Factor*) repose sur différentes études réalisées sur la protéine Rap1p. Des mutations ponctuelles ou des délétions de la partie C-terminale de Rap1p entraînaient des phénotypes d'hyperélongation non-contrôlée des télomères (Kyrion et al, 1992; Sussel & Shore, 1991). D'autres études ont montré le même phénomène, où la surexpression de la portion C-terminale de Rap1p entraînait un phénotype d'hyperélongation télomérique (Conrad et al, 1990). Les auteurs ont donc supposé que des protéines interagissaient avec la portion C-terminale de Rap1p afin d'inhiber l'élongation des télomères *in vivo*.

Les protéines Rif1p (Hardy et al, 1992b) et Rif2p (Wotton & Shore, 1997) ont été identifiées lors d'un criblage double hybride ayant comme cible la portion C-terminale de Rap1p. La délétion de *RIF1* ou de *RIF2* s'accompagne d'une hyperélongation des télomères qui ont un équilibre de tailles différents (900 vs 450 pb) (Wotton & Shore, 1997). La double délétion *RIF1/RIF2* induit une élongation extrême des télomères de façon non-contrôlée, un phénotype mimant la délétion de la portion C-terminale de Rap1p. Ces résultats suggèrent que les protéines Rif agissent de façon différentes mais synergiques afin de contrôler l'élongation des télomères par la télomérase (Wotton & Shore, 1997).

Finalement, le mécanisme de comptage de Rap1p est en fait un mécanisme de comptage de Rif1p/Rif2p, qui sera décrit dans la section 6.3.

## 5.4 Le complexe yKu70/80p.

Le complexe yKu70/80p est un complexe hétérodimérique où chaque protéine possède des implications différentes. En effet, il a été montré que yKu70p est impliquée dans la réparation par *NHEJ* alors que yKu80p est impliquée dans la maintenance télomérique, même si ces deux protéines ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Gell & Jackson, 1999; Ribes-Zamora et al, 2007). Le complexe yKu a originellement été identifié comme participant au mécanisme de *NHEJ* lors de l'induction de cassures double brin. En effet, la perte de yKu entraîne la perte d'adaptation à l'induction d'une cassure double brin non réparable par recombinaison homologue (Lee et al, 1998)

Le complexe yKu est impliqué dans la maintenance télomérique. Sa délétion entraîne un raccourcissement des télomères à environ 100pb avec une augmentation de la longueur du brin riche en G (Gravel et al, 1998; Porter et al, 1996). Ce rôle est indépendant de la fonction de yKu dans le *NHEJ* puisque la délétion de la ligase IV, qui catalyse la jonction des deux fragments d'ADN, n'a aucun effet sur la longueur des télomères (Teo & Jackson, 1997). Le complexe yKu lie directement l'ADN télomérique et sa liaison est stable tout au long du cycle cellulaire (Fisher et al, 2004; Gravel et al, 1998; Martin et al, 1999).

Il apparaît par ces expériences que yKu protège le télomère d'une dégradation abusive du brin riche en C par les nucléases. D'un autre côté, il est également possible que yKu soit impliqué dans la synthèse du brin complémentaire riche en C au moment de la réplication. Néanmoins, la délétion d'*EXO1*, un gène codant pour une exonucléase 5'-3', dans un contexte  $\Delta KU80$ , supprime quasi complètement l'augmentation du brin 3' (Bertuch

& Lundblad, 2004). De ce fait, yKu protège le télomère d'une attaque exonucléolytique du brin riche en C par Exo1p.

Une autre fonction de yKu aux télomères repose sur l'inhibition de la recombinaison homologe. En temps normal, les télomères ne sont pas ou peu sujets aux événements de recombinaison (Stavenhagen & Zakian, 1998). Cependant, la délétion de yKu augmente les événements de recombinaison télomérique dépendant de la présence des facteurs de la famille RAD (Rad52p et Rad1p) (DuBois et al, 2002). yKu est également essentiel à la mise en silence des régions sous-télomériques (Aparicio et al, 1991; Boulton & Jackson, 1998). yKu70/80p interagit avec Sir4p lors d'essais double hybride et la délétion de yKu entraîne une réduction de Sir3p et Sir4p aux télomères (Martin et al, 1999; Roy et al, 2004; Tsukamoto et al, 1997). Nous verrons dans la section 6.2.4 que yKu a également des fonctions régulatrices de la longueur des télomères en recrutant la télomérase.

## **5.5. Le complexe CST: Cdc13p-Stn1p-Ten1p.**

### **5.5.1 Cdc13p.**

Alors que chez l'humain, l'extrusion 3' va envahir la portion double brin pour former une boucle T, de telles structures n'ont pas été identifiées chez *S.cerevisiae*. Le facteur majeur de liaison à l'extrémité 3' est la protéine Cdc13p (*Cell Division Cycle 13*), qui a été découverte initialement comme requise pour la division cellulaire et la protection des télomères (Garvik et al, 1995). Les cellules *cdc13* mutantes accumulent de l'ADN simple brin aux extrémités des chromosomes, ce qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire dépendant de Rad9p (Garvik et al, 1995). *CDC13* a également été découvert indépendamment par un crible génétique ciblant des gènes influant sur la maintenance des télomères (*EST4*) (Lendvay et al, 1996; Nugent et al, 1996). Cdc13p est une protéine de

liaison à l'ADN simple brin de 105kDa ayant une affinité pour les séquences riches en G d'ADN télomérique. La liaison de Cdc13p aux télomères est essentielle à la fonction de protection puisqu'elle prévient l'attaque exonucléolytique de ces séquences (Lin & Zakian, 1996; Nugent et al, 1996). Cdc13p lie l'ADN par deux domaines *OB-fold* en position 500-686 (Lin et al, 2001; Mitton-Fry et al, 2004; Theobald & Wuttke, 2004). Cdc13p interagit avec les séquences télomériques durant le cycle cellulaire avec une liaison maximale en phase S, de manière concomitante avec la réplication des télomères (Taggart et al, 2002).

Cdc13p exerce un rôle critique dans la maintenance télomérique en agissant à la fois comme régulateur négatif et positif du recrutement de la télomérase. La délétion de la portion C-terminale de cette protéine entraîne une hyperélongation des télomères (Chandra et al, 2001). Cdc13p est également capable d'interagir avec Pol- $\alpha$  afin de coupler l'élongation des télomères par la télomérase et la synthèse du brin riche en C télomérique par la machinerie de réplication du brin retardé (Qi & Zakian, 2000).

Cdc13p interagit avec deux autres protéines, Stn1p et Ten1p, qui sont essentielles pour la fonction de protection des télomères (Grandin et al, 2001; Pennock et al, 2001; Petreaca et al, 2006). Par sa nature hétérotrimérique, le complexe CST présente des similarités structurales avec le complexe hétérotrimérique RPA, un complexe impliqué dans la protection des portions simple brin d'ADN lors de la progression des fourches de réplication. De ce fait, le complexe CST est considéré comme un complexe *RPA-like* spécialisé pour les séquences télomériques (Sun et al, 2009).

### 5.5.2 Stn1p.

*STN1* (*Suppressor of cdc Thirteen*) a été identifié par un crible génétique cherchant des suppresseurs multicopie d'une mutation nulle de *cdc13*, *cdc13-1* (Grandin et al, 1997). Stn1p peut interagir à la fois avec Ten1p et Cdc13p en crible double hybride (Chandra et al, 2001; Grandin et al, 2001; Grandin et al, 1997). Il apparaît que la fonction de protection

effectuée par Cdc13p est dépendante de la présence de Stn1p, puisque la fusion du domaine de liaison à l'ADN de Cdc13p sur Stn1p est suffisante pour protéger l'extrémité télomérique (Pennock et al, 2001). Également, la surexpression de Stn1p dans des contextes *cdc13p* mutants restaure la protection terminale des télomères (Petreaca et al, 2006). De plus, certaines mutations dans Stn1p entraînent un phénomène d'hyperélongation des télomères (Grandin et al, 1997). Stn1p apparaît donc comme un régulateur négatif de la longueur des télomères, en compétitionnant avec la télomérase pour la liaison de Cdc13p (Chandra et al, 2001). D'un autre côté, Stn1p interagit avec la sous unité Pol12 de la primase, requise pour la régulation et la protection télomérique (Grossi et al, 2004; Qi & Zakian, 2000).

Stn1p est une protéine de 495AA dont la portion N-terminale (1-281) interagit avec Ten1p et la portion C-terminale (292-495) interagit avec Cdc13p et Pol12 (Puglisi et al, 2008). *STN1* est un gène essentiel dont la létalité est révertée par la surexpression du domaine N-terminal seulement, suggérant le fait que c'est l'interaction avec Ten1p qui est essentielle. La surexpression de la portion N-terminale, incapable d'interagir avec Cdc13p, entraîne un phénotype d'hyperélongation des télomères, confirmant le fait que l'interaction Cdc13p/Stn1p est nécessaire pour réguler négativement l'action de la télomérase (Puglisi et al, 2008). L'hyperélongation observée après plus de 300 générations est énorme (4kb) et est révertée par la co-expression du domaine C-terminal de Stn1p. Ces résultats suggèrent donc que la fonction de la protéine Stn1p est médiée indépendamment par ses deux domaines : le domaine N-terminal, impliqué dans la fonction de protection télomérique et son domaine C-terminal, impliqué dans la régulation de la longueur des télomères par son interaction avec Cdc13p.

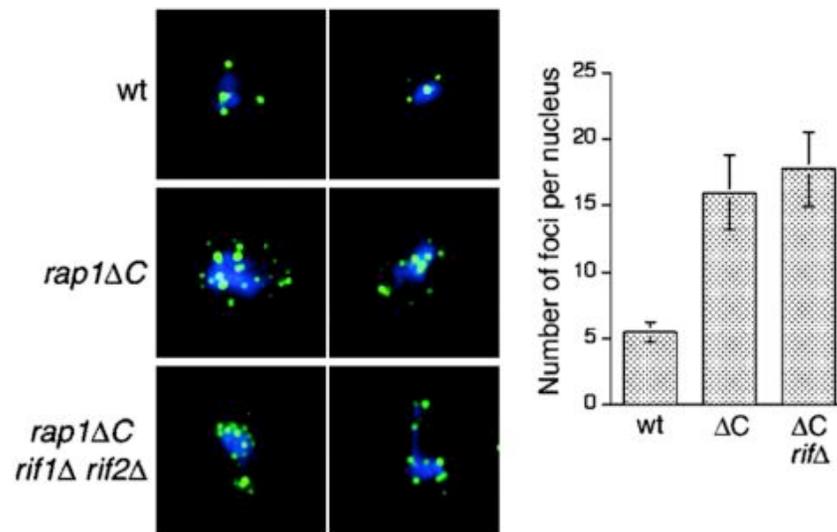
### **5.5.3 Ten1p.**

Ten1p (TElomeric pathway with StN1) est une protéine capable de lier l'ADN télomérique simple brin et d'interagir avec Cdc13p et Stn1p *in vitro* et en crible double hybride (Grandin et al, 2001; Martin et al, 2007). Cependant, la liaison directe de Ten1p aux séquences télomériques est très faible (Qian et al, 2009). Ten1p est impliquée dans la liaison de Cdc13p aux télomères, puisqu'il a été montré que la présence de Ten1p augmente l'affinité de liaison de Cdc13p aux séquences télomériques *in vitro*. L'hypothèse probable de la fonction de Ten1p dans le complexe CST est qu'elle favorise la liaison de Cdc13p sur le brin G télomérique, afin d'inhiber l'élongation des télomères, et que le complexe CST recrute la machinerie de replication du brin retardé (Qian et al, 2009).

Le complexe CST est conservé chez les mammifères et les homologues de Stn1p et Ten1p ont été identifiés récemment. Néanmoins, leurs implications dans la maintenance télomérique restent moins caractérisées (Miyake et al, 2009; Surovtseva et al, 2009).

## **5.6 Regroupement des télomères à la périphérie du noyau.**

La plupart des protéines requises pour la mise en silence des régions télomériques se retrouvent localisées en six à huit foci proches de l'enveloppe nucléaire, là où sont localisés les télomères (Gotta et al, 1996). Dans des cellules yKu ou Rif déficientes, ces foci sont altérés, suggérant le fait que yKu et les protéines Rif participent au regroupement et à l'ancrage des télomères à la périphérie du noyau (Fig. 15) (Laroche et al, 1998).



**Figure 15 : l'inhibition de l'ancrage des protéines Rif aux télomères entraîne une perte de regroupement *in situ*.**

Une construction de *RAP1* déletée du domaine d'interaction avec Rif1p et Rif2p montre un défaut de regroupement des télomères, visualisé par immunofluorescence contre la protéine Rap1p. La délétion des protéines Rif dans ce mutant n'a pas d'effet additif sur ce phénotype. Tiré de (Levy & Blackburn, 2004).

Cependant, certains télomères restent quand même accrochés à l'enveloppe dans un mutant yKu. Ce résultat suppose l'existence d'un mécanisme alternatif. La délétion de *SIR4* et *yKU70* entraîne une dispersion totale des télomères, suggérant que ce mécanisme alternatif est dépendant de Sir4p (Hediger et al, 2002). Néanmoins, la nécessité de ces protéines est différente en fonction des phases du cycle cellulaire. L'ancrage des télomères par yKu est principal en G1, mais pas essentiel en phase S tardive (Hediger et al, 2002). De plus, le passage de la fourche de réplication entraîne une inhibition de l'ancrage médié par yKu, les télomères devenant plus centraux (Ebrahimi & Donaldson, 2008).

Alors que Sir4p lie la protéine de l'enveloppe nucléaire Esc1p, le facteur membranaire liant yKu est inconnu (Taddei et al, 2004). Des preuves additionnelles sur le

fait que yKu participe à l'organisation du noyau viennent d'expériences de relocalisation de chromatine. Dans ces expériences, l'ancrage artificiel de yKu80p sur un locus chromosomique interne, non télomérique, conduit à sa relocalisation à la périphérie du noyau (Taddei et al, 2004). Également, la télomérase elle-même participerait à ce mécanisme d'ancrage des télomères (Schober et al, 2009).

Alors que la mesure de position des télomères s'effectuait par immunofluorescence contre des marqueurs comme Rap1p, de nos jours, des techniques de visualisation de la position des télomères en cellules vivantes ont été développées, notamment par l'adaptation du système bactérien LacO/LacI (Revue dans (Hediger et al, 2004)).

### **5.7 TERRA : *Telomeric-repeat containing RNA*.**

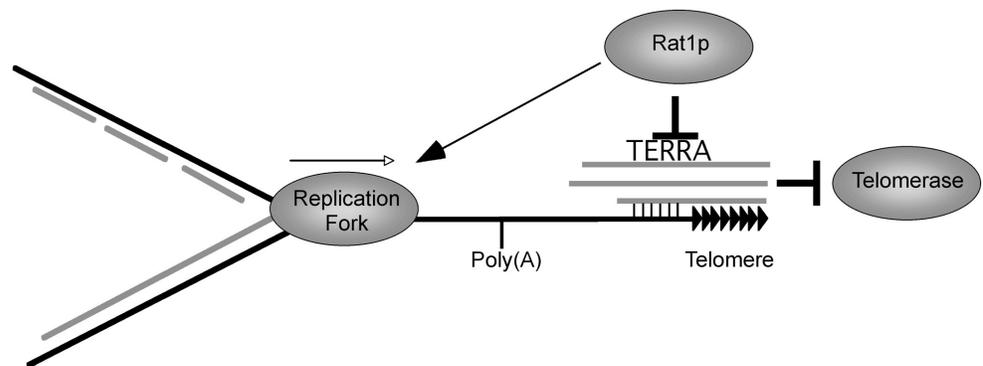
La nature hétérochromatinienne des télomères, le manque de gènes et la présence de mise en silence des régions télomériques a longtemps laissé croire que ces régions étaient complètement non-transcrites. Une étude du laboratoire du Dr Lingner a cependant prouvé le contraire (Azzalin et al, 2007). En effet, en utilisant des techniques de *Northern-blot* utilisant des sondes spécifiques des séquences télomériques humaines, ils ont pu montrer que le brin C est transcrit, conduisant à la formation d'ARN contenant des séquences UUAGGG. Ces *TERRA (telomeric-repeat containing RNA)* ont une taille variable allant de 100pb à plusieurs kb. La localisation *in situ* par *FISH* de ces molécules montre une colocalisation avec hRAP1 détecté par immunofluorescence, indiquant qu'ils colocalisent avec les télomères (Azzalin et al, 2007). De plus, les *TERRA* sont capables d'interagir avec TRF2 (Deng et al, 2009). Alors que les cellules primaires montrent trois à sept foci de *TERRA in situ*, les cellules cancéreuses peuvent posséder jusqu'à 40 foci. On pourrait supposer que ces *TERRA* sont issus de la transcription cryptique des régions télomériques hétérochromatiniennes et qu'ils sont dégradés rapidement. Néanmoins, ces molécules ont une longue demi-vie (>3h) et restent associées avec les télomères des chromosomes

métaphasiques connus pour être inactifs en transcription, suggérant le fait que ces *TERRA* sont des composants normaux des régions télomériques. Les auteurs proposent dans cette étude que les *TERRA* pourraient favoriser la création ou le maintien des régions hétérochromatiniennes des télomères humains, un mécanisme similaire à l'ARN non-codant *Xist* pour la mise en silence du chromosome X (Ng et al, 2007).

La découverte des *TERRA* chez les mammifères a soulevé la question de la présence de ce type de transcrit dans d'autres organismes. Effectivement, ces transcrits télomériques ont été détectés dans plusieurs espèces, notamment le poisson zèbre, la souris et le hamster (Ho et al, 2008; Schoeftner & Blasco, 2008). Cependant, ils n'ont pas été identifiés chez *S.cerevisiae*. Le laboratoire du Dr Lingner a donc tenté de visualiser la présence de *TERRA* chez la levure. Même si la concentration de *TERRA* est extrêmement faible dans des cellules sauvages, les auteurs ont pu visualiser une accumulation de transcrits télomériques dans des cellules thermosensibles pour la protéine Rat1p (Luke et al, 2008). Rat1p est une exonucléase à ARN 5'-3' impliquée dans la terminaison de la transcription par les ARN polymérase II, la maturation des ARNr et l'export des ARNm (Amberg et al, 1992; Kim et al, 2004; Petfalski et al, 1998). Alors que les *TERRA* peuvent atteindre plusieurs kb chez l'humain, ils sont plus courts chez *S.cerevisiae* (100-1200nt). Les télomères font en moyenne 300pb, ce qui implique que les *TERRA* supérieurs à 300pb contiennent des séquences sous-télomériques. De ce fait, la transcription des *TERRA* doit être initiée dans les régions sub-télomériques et progresser vers le télomère en transcrivant le brin riche en C. En utilisant différentes constructions répressibles des ARN polymérase I, II et III, les auteurs ont pu déterminer qu'ils sont transcrits par l'ARN polymérase II, et sont donc polyadénylés (Luke et al, 2008).

Ils ont également mis en évidence que les cellules *rat1-1* avaient des télomères courts (150pb), pointant vers un rôle des *TERRA* dans la régulation de la longueur des télomères. Le rôle de Rat1p comme facteur influant la longueur des télomères apparaît direct, puisque le mutant *rat1-1* n'a que peu d'impact sur l'expression des composants de la télomérase. De ce fait, l'accumulation de *TERRA* aux télomères préviendrait l'activité

téломérase par deux différents mécanismes possibles. Les auteurs proposent des modèles intéressants dans lesquels les *TERRA* inhibent directement l'activité de la téломérase par hybridation de la séquence de son composant ARN. Deuxièmement, il est possible que les *TERRA* inhibent le recrutement de la téломérase en s'hybridant aux télomères, masquant ainsi le substrat (Fig. 16) (Luke et al, 2008). Comme la surexpression d'une ARNaseH *in vivo*, qui réduit les niveaux de *TERRA*, restaure le phénotype de télomères courts induits par la mutation *rat1-1*, la deuxième hypothèse reste la plus plausible.



**Figure 16 : modèle proposé de la régulation de la longueur des télomères par les *TERRA*.**

Rat1p contrôle l'accumulation aux télomères des *TERRA* qui inhibent le recrutement de la téломérase. Tiré de (Luke et al, 2008).

Néanmoins, les *TERRA* sont des nouvelles molécules dont les fonctions restent mal comprises aujourd'hui, mais apparaissent comme des régulateurs longtemps insoupçonnés de la longueur des télomères.

## 5.8 Réplication des télomères et synthèse de l'extrusion 3' chez *S.cerevisiae*.

Les télomères se répliquent en fin de phase S du cycle cellulaire à cause de l'initiation tardive des ARS des régions X et Y' (Raghuraman et al, 2001). Cette réplication tardive est liée au mécanisme de TPE qui retarde l'ouverture des origines de réplication dans les régions X et Y' (Ferguson & Fangman, 1992). L'ancrage des protéines Sir proche d'une ARS activée précocement lors de la phase S retarde son initiation en phase tardive (Zappulla et al, 2002). Inversement, des mutants de Sir3p, défectueux dans la mise en silence, montrent une initiation précoce des origines dans les régions Y' (Stevenson & Gottschling, 1999). De la même manière, les cellules déletées du complexe yKu possèdent des télomères dispersés, qui activent leurs origines de façon précoce, suggérant le fait que l'ancrage des télomères à la peripherie du noyau retarde l'activation des origines (Cosgrove et al, 2002)

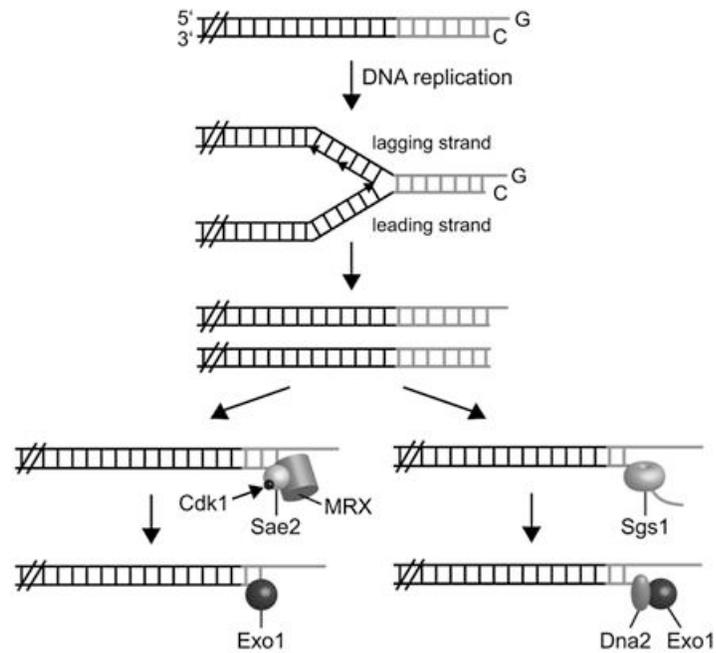
Bien que les télomères de *S.cerevisiae* ne possèdent pas de structures complexes comme les télomères humains, ils ont besoin d'hélicases afin d'être répliqués efficacement. En effet, les hélicases Sgs1p (homologue aux WRN et BLM) et Rrm3p participent à la réplication des télomères en facilitant le passage des fourches de réplication dans les régions non-nucléosomiques (Ivessa et al, 2000). Le passage de la fourche de réplication est nécessaire à la génération des extrusion 3' simple brin (Dionne & Wellinger, 1998). Même si ces extrusions peuvent être détectées dans toutes les phases du cycle cellulaire (10-14 bases) elles sont prédominantes en phase S où de 50 à 100nt simple brin sont détectés (Larrivee et al, 2004; Wellinger et al, 1993a; Wellinger et al, 1993b). La génération de cette extrusion de l'extemite 3' riche en G est indépendante de la présence de la télomérase et intervient à la fois sur le brin direct et le brin retardé. Alors que la présence d'extrusion 3' est générée par la machinerie de replication du brin retardé de façon naturelle, elle dépend d'un mécanisme de dégradation actif pour le brin direct. Ces résultats suggèrent qu'il existe une dégradation spécifique du brin riche en C par l'action de nucléases (Dionne & Wellinger, 1996; Wellinger et al, 1996).

Sur le brin retardé, la dernière amorce d'ARN nécessaire à la synthèse du dernier fragment d'Okazaki doit être enlevée. Cette étape est normalement réalisée lors de la

synthèse du fragment d'Okazaki en aval par l'action de Dna2p et Rad27p chez la levure, une hélicase et une exonucléase impliquées dans la maturation de ces fragments (Revue dans (Rossi et al, 2006)). Afin d'enlever le dernière amorce d'ARN, différents mécanismes ont été proposés. En effet, il a été montré que Pif1p, une hélicase ARN/ADN agissant comme régulateur négatif de la télomérase (Schulz & Zakian, 1994), coopère avec Dna2p afin d'enlever la dernière amorce d'ARN (Budd et al, 2006). De plus l'ARNase H2 participe à la dégradation des amorces lors de la synthèse du brin retardé, et interagit avec Rif2p (Jeong et al, 2004; Qiu et al, 1999).

L'importance de la résection du brin 5' est régulée négativement par les protéines Cdc13p, yKu, Rap1p et dépend de l'activité Cdk1 (*cyclin dependent kinase*), présente en phase S-G2 (Bertuch & Lundblad, 2003; Negrini et al, 2007; Vodenicharov & Wellinger, 2006). Cette résection est également dépendante du recrutement du complexe MRX (Mre11p, Rad50p, Xrs2p), un complexe trimérique impliqué dans la maturation des cassures double brin (Diede & Gottschling, 2001; Frank et al, 2006; Ira et al, 2004; Larrivee et al, 2004; Vodenicharov & Wellinger, 2006). Alors que la fonction nucléase de Mre11p n'est pas nécessaire pour la résection 5', ce complexe semblait jouer un rôle architectural et les nucléases directement impliquées étaient inconnues.

Dans une étude récente, le laboratoire du Dr Pia-Longhese a pu montrer que la résection du brin riche en C dépend de plusieurs voies génétiques impliquant les nucléases Sae2p, MRX, Sgs1p, Exo1p et Dna2p (Fig.17) (Bonetti et al, 2009). Toutes ces protéines sont utilisées de façon normale lors de la maturation des cassures double brin.



**Figure 17 : illustration du phénomène de résection du brin riche en C.**

Cette résection est effectuée par l'intermédiaire de l'attaque nucléolytique dépendant de la présence des protéines MRX, Sae2p, Dna2p, Exo1p et Sgs1p. La modification post-traductionnelle de Sae2p par CDK1 est représentée. Tiré de (Bonetti et al, 2009).

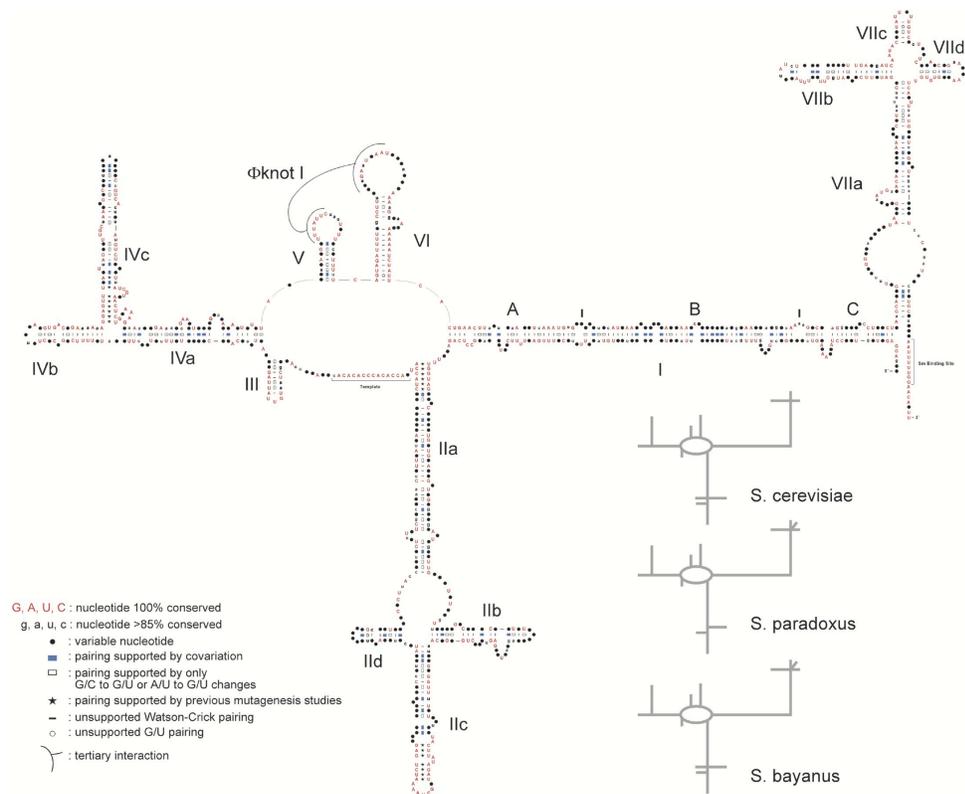
Même si toutes ces protéines sont importantes pour la maturation des télomères en vue de leur éloration, leur inter-dépendance reste mal comprise.

La résection du brin 5' et l'incapacité de répliquer totalement le brin retardé va conduire au recrutement de la télomérase afin de combler l'attrition télomérique. Suite à l'action de cette enzyme, la machinerie de répllication du brin retardé va être recrutée afin de répliquer la portion d'ADN néo-synthétisée.

## 6. La télomérase de *S.cerevisiae*.

### 6.1 L'ARN *TLC1*, squelette et matrice de la télomérase.

En 1994, l'équipe du Dr Dan Gottschling a mis en place un crible génétique dans le but d'identifier des facteurs qui, lorsque surexprimés, induiraient la perte de TPE chez la levure *S.cerevisiae*. Un des gènes identifié fut nommé *TLC1* (*Telomerase component 1*), le composant ARN de la télomérase (Singer & Gottschling, 1994). Plus tard, par analyse et alignement de séquences ainsi que par cartographie à l'ARNase H, l'équipe du Dr Wellinger a identifié la structure secondaire de cet ARN (Fig. 18) (Dandjinou et al, 2004).



**Figure 18 : structure secondaire proposée pour l'ARN *TLC1* et degré de conservation entre les espèces de *Saccharomyces*.**

La structure proposée a été déterminée par alignement de séquences et cartographie à l'ARNase H. Les nucléotides marqués en rouge ou noir montrent un fort taux de conservation. Les schémas en gris (en bas à droite) montrent, d'un point de vue simplifié, la conservation de structure entre trois espèces de *Saccharomyces*. Schéma adapté de (Dandjinou et al, 2004)

L'ARN *TLC1* fait partie de la classe des ARN non codants dont la seule fonction connue à ce jour est son implication dans la maintenance des télomères. L'ARN *TLC1* mesure 1,3kb, ce qui est long par rapport à son homologue humain (451nt pour *hTR*) (Dandjinou et al, 2004). Néanmoins cette taille peut être réduite à 460nt et encore fonctionner *in vivo* (Livengood et al, 2002; Zappulla et al, 2005). Ces résultats suggèrent que l'ARN *TLC1* contient des régions essentielles et que d'autres, moins importantes, sont utilisées pour l'assemblage de la télomérase ou pour sa régulation fine. Il se structure en de nombreuses tiges boucles et contient en son centre un domaine possédant la matrice de rétro-transcription. L'ARN *TLC1* possède, comme tous les ARN télomérasiques, une structure en pseudo-nœud qui est essentielle à l'activité télomérase. Le pseudo-nœud est hautement conservé dans les espèces de *Saccharomyces*.

Certaines caractéristiques de séquences présentes dans l'ARN *TLC1* suggèrent que cet ARN pourrait avoir des similitudes avec la classe des petits ARN nucléaires (snARN) (Seto et al, 1999).

L'ARN *TLC1* est transcrit par l'ARN polymérase II et sera donc coiffé et polyadénylé comme un ARN messager (Chapon et al, 1997). Cependant, cette forme poly A+ n'est que minoritaire dans les cellules et correspond à une forme différente (peut être précurseur) de l'ARN *TLC1* mature (Seto et al, 1999). En effet, il a été déterminé par immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffes tri-méthylées que l'ARN *TLC1*

possédait bien le type de coiffe hyper-méthylée retrouvé chez les ARN de classe snARN et snoARN (Seto et al, 1999).

Cette ressemblance flagrante suggère que la biogenèse de l'ARN *TLC1* requiert des facteurs impliqués dans la biogenèse des snARN. En étudiant la séquence 3' de l'ARN *TLC1*, les auteurs se sont rendus compte qu'il possédait un site putatif de liaison aux protéines Sm, protéines responsables de la maturation et de la protection des extrémité 3' des snARN et snoARN. Ce site s'est révélé être identique à celui du snARN *U4*, suggérant fortement l'importance des protéines Sm pour la synthèse de la forme mature de l'ARN *TLC1* (Seto et al, 1999). En délétant la région de fixation putative des protéines Sm sur l'ARN *TLC1*, les auteurs ont remarqué une baisse drastique de ses niveaux dans les cellules. De plus, la longueur des télomères dans cette construction est raccourcie par rapport aux souches sauvages, suggérant fortement la liaison de protéines Sm à l'extrémité 3' de l'ARN *TLC1*. Cette liaison serait importante pour la fonction de cet ARN, notamment pour l'accumulation de la forme mature de l'ARN *TLC1*. Cette hypothèse a été confirmée par co-immunoprécipitation de Est2p avec deux protéines Sm (Smd1p et Smd3p) (Seto et al, 1999).

En conclusion, ils ont montré que l'ARN *TLC1* partage deux caractéristiques communes avec les snARN : la présence d'une coiffe tri-méthylée et la liaison de protéines Sm importantes pour la stabilité de cet ARN.

## **6.2 La télomérase, un complexe ribonucléoprotéique.**

Deux ans après la découverte de l'ARN *TLC1*, le laboratoire du Dr Lundbald a publié un crible génétique où vingt deux mutants défectifs pour l'élongation des télomères furent identifiés (Lendvay et al, 1996). Treize mutants correspondaient au gène *EST1* précédemment identifié. Cependant, trois autres gènes ont été identifiés, nommé *EST2*, *3* et *4* (*EST4* correspond au gène *CDC13*). Les auteurs proposent que ces quatre protéines

appartiennent à la même voie génétique puisque la combinaison des mutations *EST* dans une seule souche n'aggrave pas le phénotype de sénescence (Lendvay et al, 1996).

La concentration des protéines Est est extrêmement basse *in vivo*, estimée à environ cent protéines par cellules pour Est2p (communication personnelle du Dr Wellinger). L'accumulation des Estp est contrôlée par différentes voies et notamment par les facteurs du *NMD* (*Non-sense Mediated Decay*), un système de contrôle de qualité impliqué dans la dégradation des ARNm contenant des codons stop prématurés. La délétion des facteurs du *NMD* (famille UPF) s'accompagne d'une augmentation de l'expression de tous les composants de la télomérase (Dahlseid et al, 2003). Néanmoins, nous ne savons pas si cet effet est direct ou génétique. De même, la concentration en ARN *TLC1* est extrêmement basse dans les cellules, sub-stoïchiométrique par rapport au nombre de télomères (vingt neuf molécules d'ARN *TLC1* pour trente deux télomères) (Mozdy & Cech, 2006; Mozdy et al, 2008). Cette concentration basse est nécessaire puisque la surexpression faible de l'ARN *TLC1* s'accompagne d'une augmentation de la longueur des télomères au cours du temps (Mozdy & Cech, 2006). Ce phénomène est identique chez l'humain, où la surexpression de la télomérase induit une élongation progressive des télomères (Cristofari & Lingner, 2006). De ce fait, le contrôle de l'expression des Estp et de l'ARN *TLC1* est un des premiers niveaux de la régulation de l'activité télomérase.

Depuis le crible génétique de V.Lundblad, la structure et la fonction des protéines Estp a été identifiée.

### 6.2.1 Est2p

Est2p possède des homologies de motif avec les rétro-transcriptases et est responsable de l'activité catalytique de la télomérase. La protéine Est2p a été identifiée par homologie de séquence avec la protéine p123 des euplotes connue pour être responsable de l'élongation des télomères (Fig. 19) (Lingner et al, 1997b).



La région N-terminale de Est2p est responsable de l'interaction avec l'ARN *TLC1* et son interaction ne dépend pas de la présence des autres Estp (Friedman & Cech, 1999; Hughes et al, 2000). Néanmoins, l'association de Est2p aux télomères est dépendante de la présence de l'ARN *TLC1* (Taggart et al, 2002).

*In vitro*, le complexe Est2p-ARN *TLC1* est suffisant pour permettre l'addition de répétitions télomériques sur des amorces d'ADN télomérique (Lingner et al, 1997). Cependant, l'activité *in vivo* de cette enzyme nécessite la présence d'autres facteurs, comme Est1p et Est3p. Cette dépendance vis-à-vis de ces facteurs *in vivo* suggère qu'ils sont nécessaires pour intégrer le « core télomérase » dans l'environnement cellulaire, comme il a été suggéré pour d'autres complexes RNP comme les ribosomes par exemple.

### 6.2.2 Est1p

Est1p est un facteur essentiel à l'activité télomérase *in vivo*. Il lie la région de 535-707 dans la tige IVc de l'ARN *TLC1* (Friedman et al, 2003; Livengood et al, 2002; Seto et al, 2002), une région très conservée dans d'autres espèces, comme *Candida albicans* (Gunisova et al, 2009). La protéine Est1p possède différentes fonctions au niveau du recrutement, de l'activation et de la processivité de la télomérase.

En effet, la délétion de Est1p entraîne la perte de liaison de Est2p aux télomères en phase S tardive, soulignant son importance pour l'association télomère-télomérase en fin de phase S du cycle cellulaire (Chan et al, 2008).

Est1p est également capable de lier l'ADN faiblement mais la fonction de cette liaison était inconnue (DeZwaan & Freeman, 2009; Virta-Pearlman et al, 1996). Récemment, il a été montré qu'en liant le brin télomérique riche en G, Est1p favorise la formation de G-quadruplex. Ce mécanisme s'est avéré essentiel pour l'élongation des télomères *in vivo*, puisque des mutations dans le domaine EF de Est1p, important pour la formation des G-quadruplex, conduit à la sénescence (Zhang et al, 2010). Les auteurs

proposent un modèle intéressant dans lequel la stimulation de la formation de G-quadruplex dans le brin riche en G empêche l'hybridation de la matrice de l'ARN *TLC1* de façon interne. L'exposition de l'extrémité 3' terminale faciliterait donc son ancrage à l'extrémité du brin riche en G (Zhang et al, 2010). La protéine Est1p est également capable de stimuler la processivité intrinsèque de la télomérase *in vitro*, même si elle n'influe pas sur le nombre de répétitions télomérique ajoutées (DeZwaan & Freeman, 2009).

Une des fonctions essentielle de Est1p repose sur sa capacité d'activation de la télomérase aux télomères. On sait, depuis les études de S. Marcand, que la télomérase est active en phase S tardive et en phase G2 du cycle cellulaire (Marcand et al, 2000). Cependant, on ne savait pas à quoi était dû cette régulation en fonction du cycle. L'équipe du Dr Zakian a pu montrer en 2002 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que l'interaction de Est1p avec les télomères augmente en fin de phase S (Taggart et al, 2002). Les auteurs ont également trouvé que la sous unité catalytique Est2p était déjà localisée aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire, avant la phase S. Les auteurs proposent donc un modèle dans lequel Est1p serait l'activateur du complexe télomérase pré-assemblé sur le télomère et que le pic de Est1p en fin de phase S activerait la télomérase d'une manière régulée en fonction du cycle cellulaire (Taggart et al, 2002).

Cependant, une autre étude a montré que la concentration de la protéine Est1p est régulée par le protéasome. Ils proposent que la protéine Est1p est instable en phase G1 et début S (Osterhage et al, 2006). Lors de la progression de la cellule en fin de phase S, la protéine Est1p est stabilisée et permettrait d'activer le complexe télomérase. Les auteurs suggèrent également que la protéine Est1p participe au recrutement de la protéine Est3p sur le complexe télomérase.

### 6.2.3 Est3p

Est3p est un composant essentiel à l'activité télomérase (Hughes et al, 2000). La protéine Est3p est capable de lier directement la protéine Est2p par son domaine N-terminal (Friedman et al, 2003). Certaines études ont également montré que Est3p dimérise *in vivo* et que des mutations empêchant sa dimérisation s'accompagnent d'un raccourcissement des télomères (Yang et al, 2006). Ce résultat suggère que la dimérisation d'Est3p est importante pour la fonction normale de la télomérase *in vivo*.

Néanmoins les caractéristiques biochimiques de Est3p ne sont que très peu connues. Est3p est capable de lier à la fois l'ADN et l'ARN et posséderait des activités ADN/ARN hélicase qui sont maximales en présence de GTP (Sharanov et al, 2006). De ce fait, Est3p serait également capable de lier l'ADN lorsque complexé au GTP. Les auteurs proposent que cette liaison interviendrait *in vivo* afin de résoudre les structures secondaires des télomères ou de faciliter la processivité de la télomérase. Comme Est3p dimérise, ils proposent qu'une molécule de Est3p lie l'ARN *TLC1* et que l'autre participe à la processivité en résolvant les duplex ARN-ADN, mais aucune preuve directe n'a été apporté.

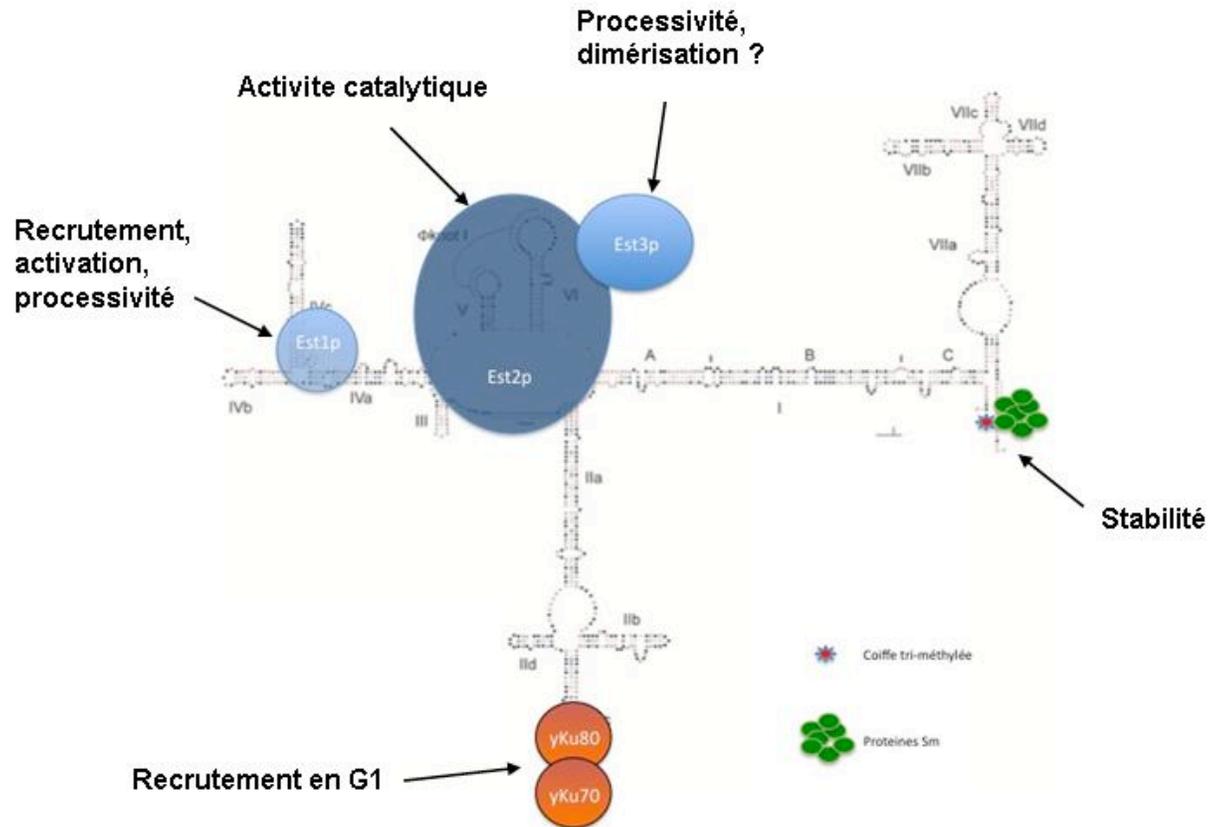
De plus, comme Est3p est capable de lier l'ARN et de favoriser l'interaction ARN-ARN, il est possible que cette protéine soit impliquée dans la biosynthèse de la télomérase, en modifiant la structure secondaire de l'ARN *TLC1* au cours de l'assemblage de l'enzyme. Néanmoins, les voies de biosynthèse et d'assemblage de la télomérase de *S.cerevisiae* sont inconnues.

#### **6.2.4 yKu70p/80p.**

Alors que yKu a des fonctions de protection des télomères comme nous l'avons vu précédemment, ce complexe va également réguler de façon positive leur longueur. yKu lie une région de 48 nt sur l'ARN *TLC1* (IIc) (Fisher et al, 2004; Stellwagen et al, 2003). La génération de mutants dans l'ARN *TLC1* incapable de lier yKu (*TLC1Δ48*) ou *yku80-i135*,

un mutant défectif de yKu80p, a montré que ces mutants ont une longueur des télomères réduite, suggérant que la liaison de yKu est nécessaire pour obtenir une activité télomérase normale *in vivo*. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que yKu est associé aux télomères tout au long du cycle et son enrichissement est stable (Fisher et al, 2004; Taggart et al, 2002). Néanmoins, dans des cellules  $\Delta KU70$  ou  $TLC1\Delta 48$ , l'interaction de Est2p avec les télomères est perdue en G1. Ce résultat suggère que yKu est nécessaire au recrutement de la télomérase en phase G1 du cycle cellulaire (Fisher et al, 2004).

Comme la télomérase humaine, l'ARN *TLC1* sert de squelette pour l'assemblage des composants du complexe qui ont des fonctions diverses impliquées dans le recrutement et la processivité de l'enzyme (Fig. 20).



**Figure 20 : illustration des fonctions et des sites de liaisons des protéines Est et du complexe  $\gamma$ Ku70/80 sur l'ARN *TLC1*.**

La coiffe tri-méthylée et les protéines Sm sont également représentées. Adapté de (Dandjinou et al, 2004).

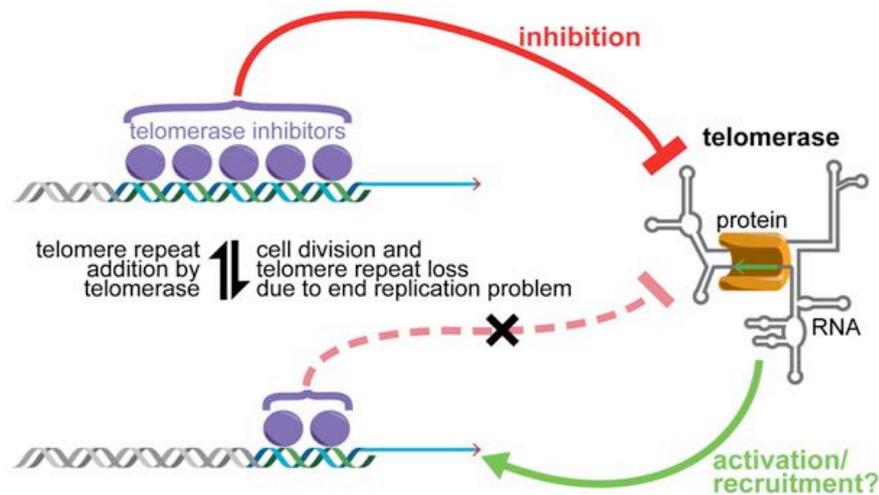
### **6.3 L'inhibition locale de la régulation négative induit le recrutement préférentiel de la télomérase aux télomères courts en fin de phase S.**

Comme nous l'avons vu, le recrutement de la protéine Est1p en fin de phase S entrainerait l'activation des complexes télomérase pré-recrutés. Cependant, l'assemblage prématuré du complexe en phase G1 par la surexpression de Est1p ne permet pas l'addition de nouveaux télomères, ce qui suggère la présence de modifications post-traductionnelles activatrices. En effet, l'intervention de CDK1 est nécessaire à la génération d'extrusions riches en G (Frank et al, 2006; Osterhage et al, 2006).

En 2004, Teixeira et coll. ont montré que ce n'est pas la totalité des trente deux télomères de levure qui étaient allongés en phase S mais seulement entre 7 et 10% de ceux-ci (Teixeira et al, 2004). Cette étude suggère donc que seulement une partie des télomères sera compétente pour le recrutement et l'activation de la télomérase aux télomères, alors que le recrutement ou l'activation locale de la télomérase sur les autres télomères sera réprimée.

Tout d'abord, il apparaît que ce sont les télomères les plus courts qui vont recruter préférentiellement la télomérase (Chang et al, 2007; Sabourin et al, 2007). Cette théorie vient de l'observation que si un télomère est raccourci de façon abrupte, le nombre de nucléotides ajoutés par la télomérase va diminuer au fur et à mesure de son élongation (Marcand et al, 1999). Ce mécanisme est dépendant de Rap1p, puisque l'ancrage de Rap1p sur un télomère induit son raccourcissement, de façon proportionnelle au nombre de molécules de Rap1p ajoutées (Marcand et al, 1997). Les télomères les plus longs contiennent beaucoup de sites de fixation pour la protéine Rap1p. Cette dernière interagit avec les protéines Rif1p et Rif2p. Il a été montré que la délétion des protéines Rif suffit à induire une hyperélongation des télomères (Teixeira et al, 2004). D'un autre côté, l'ancrage des protéines Rifp sur un télomère inhibe son élongation (Levy & Blackburn, 2004). Les auteurs ont donc proposé un mécanisme de comptage où la présence de nombreuses protéines Rif sur les télomères les plus long inhiberait l'activation de la télomérase sur ceux-ci, les rendant non extensibles (Levy & Blackburn, 2004; Teixeira et al, 2004). Cet effet a été vérifié par STEX (*Single Telomere Extension Assay*) où il a été montré que la délétion des facteurs Rif induit une élongation massive et spécifique des télomères les plus

courts (Chang et al, 2007). Au fur et à mesure des réplifications et donc du raccourcissement des télomères, les protéines Rif ne seraient plus en nombre suffisant pour réprimer la télomérase, rendant les télomères dans un état extensible (Fig. 21) (Teixeira et al, 2004). Cette absence d'inhibition entrainerait l'activation de la télomérase sur les télomères les plus courts.

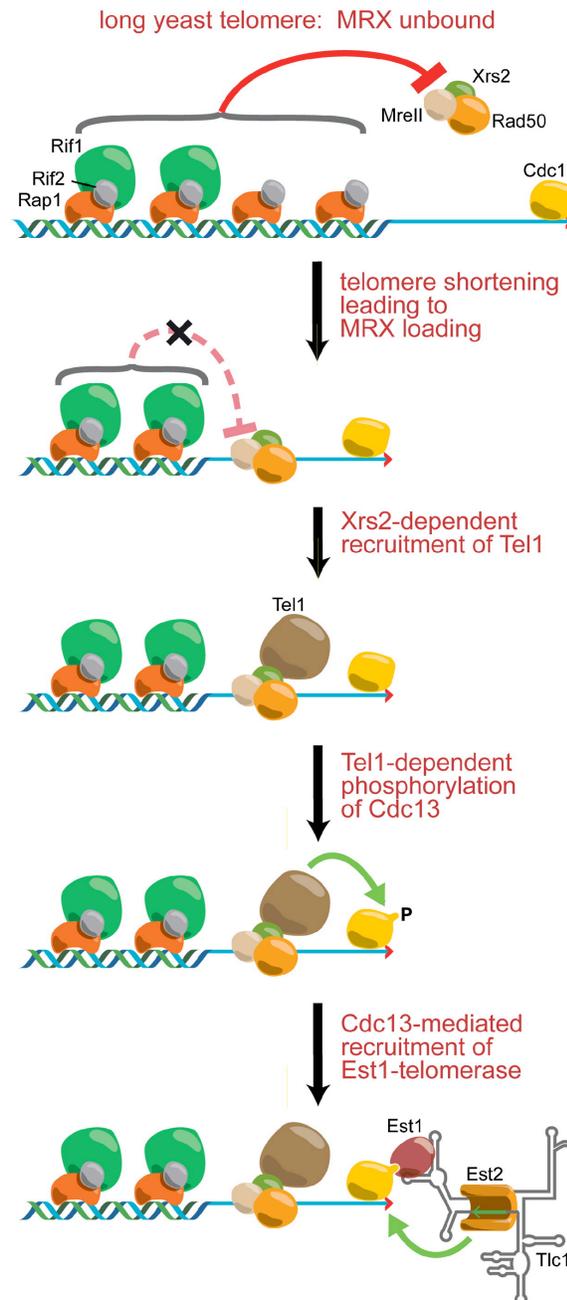


**Figure 21 : illustration du mécanisme de comptage qui serait responsable du recrutement préférentiel de la télomérase aux télomères les plus courts.**

La baisse de concentration de régulateurs négatifs Rif1/Rif2p (en violet) par la perte de sites de fixation de Rap1p au cours des générations lèverait l'inhibition du recrutement ou de l'activation de la télomérase aux télomères. Tiré de (Bianchi & Shore, 2008)

Au cours de la réplication du télomère, la portion simple brin s'allonge dû à l'action des exonucléases nécessaires à la maturation des télomères, les rendant compétentes pour le recrutement de la télomérase en phase S (Wellinger et al, 1993a; Wellinger et al, 1993b). La formation de cette extrusion simple brin est dépendante de la protéine Mre11 du complexe MRX (Mre11p, Rad50p, Xrs2p) et de différentes nucléases. Lorsqu'un télomère devient trop court et échappe à la régulation négative par le complexe Rif, le complexe MRX va être recruté de façon précoce et induire la maturation du télomère (Takata et al, 2005). L'augmentation de la portion simple brin crée des sites de fixation pour la protéine

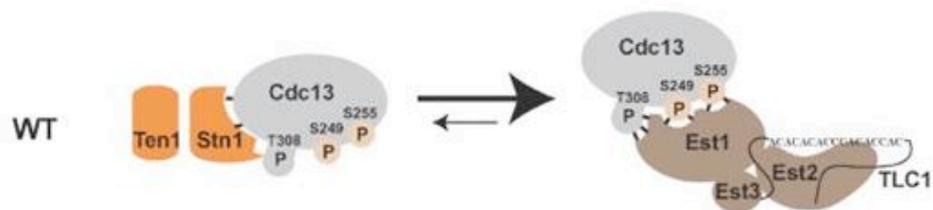
Cdc13p, qui interagit à son tour avec la protéine Est1p dont la concentration est maximale en fin de phase S (Evans & Lundblad, 1999; Pennock et al, 2001). Le recrutement de Est1p va induire le recrutement du complexe Est2p-ARN *TLC1* à l'extrémité du télomère ainsi que l'élongation du télomère (Fig. 22). Une forme inactive de Cdc13p, *cdc13-2*, abolit l'interaction avec Est1p. Les cellules *cdc13-2* sénescence rapidement (Lendvay et al, 1996). A la fin de l'élongation, Cdc13p va recruter Fen1p et la primase afin de répliquer la portion télomérique néo-synthétisée (Diede & Gottschling, 1999).



**Figure 22 : illustration du recrutement hiérarchique de la télomérase aux télomères.**  
 La liaison du complexe MRX aux télomères courts induit le recrutement de Tel1p. Tel1p, par la phosphorylation activatrice de Cdc13p, induit le recrutement de la télomérase, par l'interaction Cdc13p-Est1p. Tiré de (Bianchi & Shore, 2008)

Le recrutement de Cdc13p aux télomères n'est cependant pas suffisant pour entraîner une activation de la télomérase et plusieurs modifications post traductionnelles dépendantes du cycle cellulaire ont été identifiées. La liaison du complexe MRX va recruter la kinase Tel1p (homologue de ATM) de part son interaction avec la portion C-terminale de Xrs2p (Sabourin et al, 2007). Tel1p phosphoryle des serines sur Cdc13p et augmente l'affinité de Est1p pour Cdc13p (Tseng et al, 2006 ; Goudsouzian et al, 2006). De la même manière, CDK1 phosphoryle plusieurs résidus sur Cdc13p en phase S et G2. Ces phosphorylations diminuent l'affinité pour le régulateur négatif Stn1p et augmentent l'affinité de Cdc13 pour Est1p, conduisant au recrutement de la télomérase (Fig.23) (Li et al, 2009).

Ces deux mécanismes agissent de façon synergique afin de coordonner le recrutement de la télomérase à la progression du cycle cellulaire. Sachant que la télomérase est déjà ancrée aux télomères par le complexe yKu en phase G1, il a été proposé que cette enzyme soit recrutée de façon séquentielle. Elle serait tout d'abord stablement associée aux télomères en phase G1 par le complexe yKu. Puis, le recrutement et les modifications post-traductionnelles de Cdc13p aux extrémités simple brin induiraient un glissement de la télomérase vers l'extrémité terminale du télomère (Wu et al, 2009). Ce modèle implique donc une interaction stable entre la télomérase et le télomère en phase G1/S du cycle cellulaire.



**Figure 23 : illustration des modifications post-traductionnelles de Cdc13p participant à la régulation de la télomérase en fonction du cycle cellulaire.**

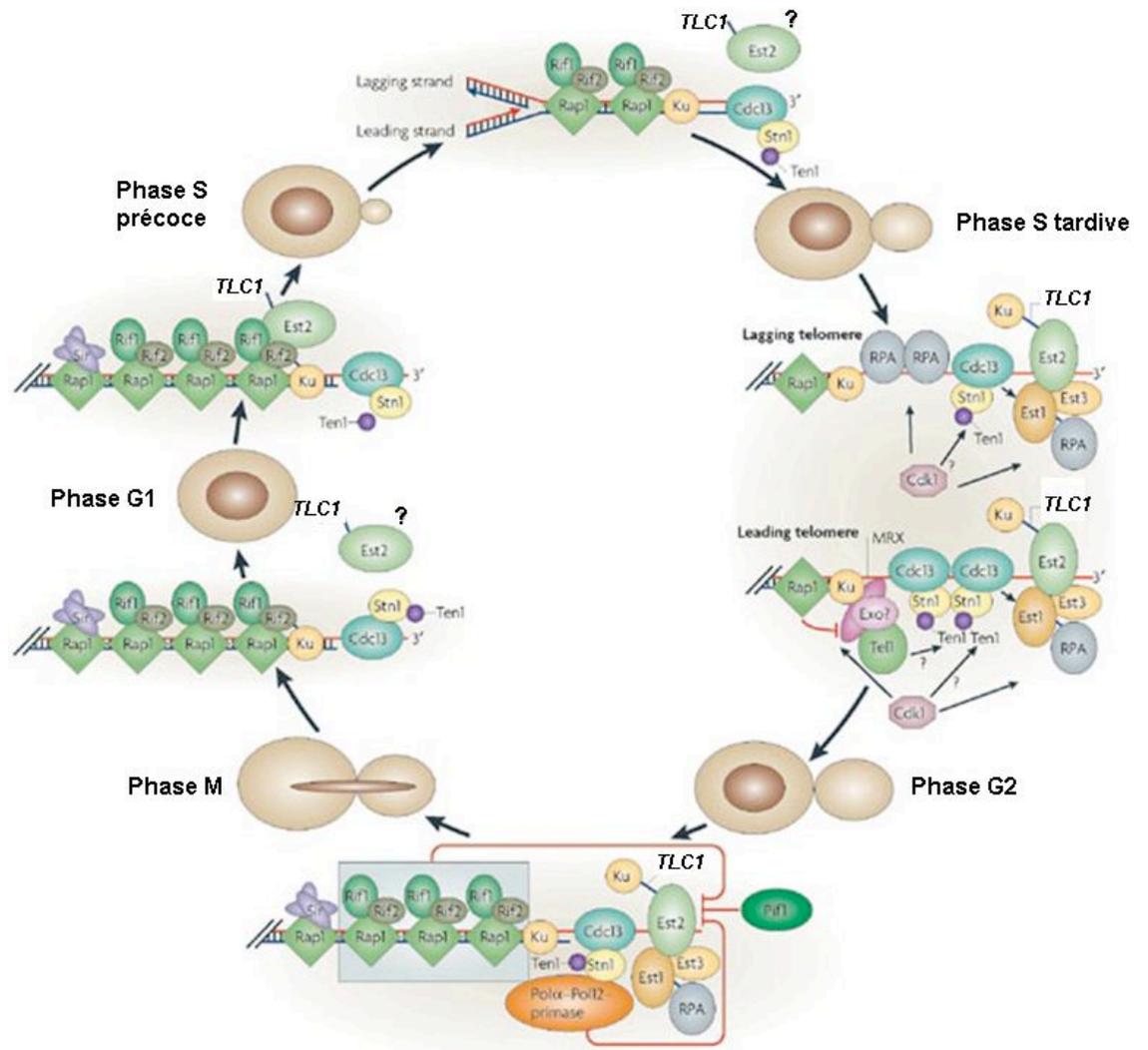
CDK1 phosphoryle la thréonine 308 de Cdc13p en phase S. Tel1p phosphoryle les sérine 249 et 255. La phosphorylation de Cdc13p abolit la régulation négative du recrutement de la télomérase effectuée par Stn1p. Tiré de (Li et al, 2009).

## **6.4 Terminaison de l'élongation des télomères.**

Beaucoup d'équipes ont identifié des facteurs qui, si mutés, induisent un raccourcissement des télomères. Cependant, des régulateurs négatifs de la télomérase n'avaient pas été identifiés. En 1994, l'hélicase Pif1p a été découverte (Schulz & Zakian, 1994). Sa surexpression entraîne un raccourcissement des télomères et inversement, sa délétion entraîne un phénotype d'hyper-élongation. Par études biochimiques, il a été montré que cette protéine inhibe l'action de la télomérase aux télomères, en étant capable de lier l'ADN et de défaire les hybrides ADN/ARN (Boule et al, 2005). La surexpression de Pif1p entraîne une forte baisse de l'association de Est1p et Est2p avec les télomères, mesurée par ChIP (Boule et al, 2005). De plus, il est possible que cette hélicase interagisse directement avec la télomérase puisque certaines mutations de Est2p diminuent son activité (Eugster et al, 2006). Pif1p est néanmoins une protéine ayant des fonctions pleïotropiques puisqu'elle participe également à la maintenance mitochondriale et à la réplication des loci d'ADNr (Ivessa et al, 2000).

## **6.5 Dynamique de l'association télomère-télomérase au cours du cycle cellulaire chez *S.cerevisiae*.**

En prenant en compte les études de recrutement de la télomérase aux télomères, un modèle d'interaction télomère-télomérase au cours du cycle cellulaire a été proposé (Fig. 24).



**Figure 24 : modèle du recrutement et de l'activation de la télomérase aux télomères au cours du cycle cellulaire chez *S.cerevisiae*.**

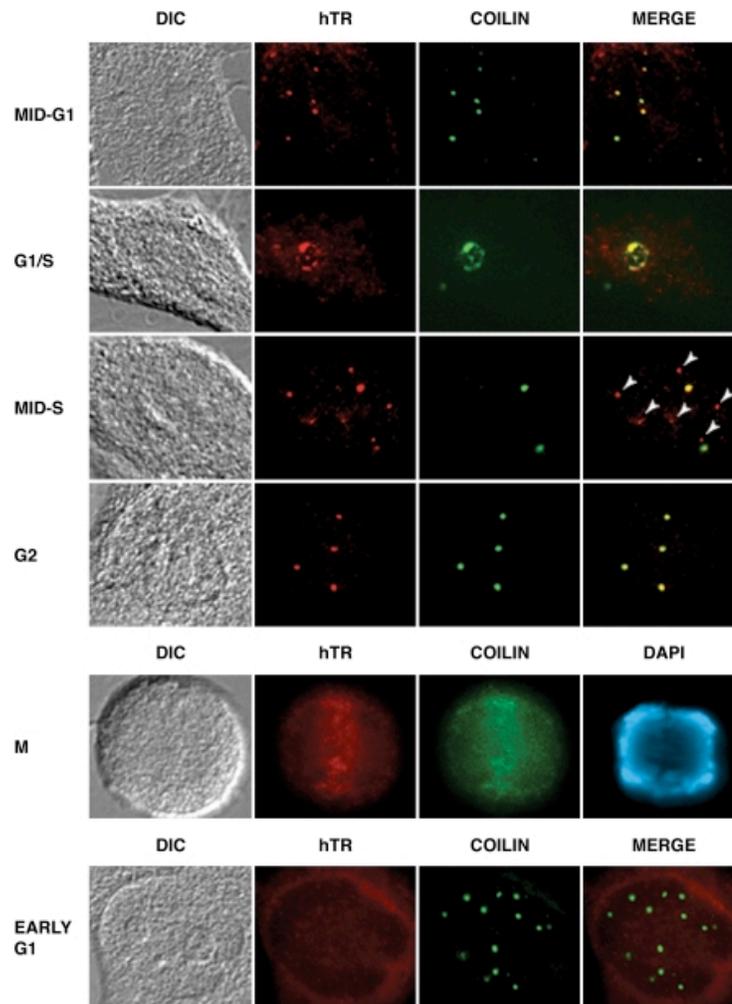
Differents facteurs interagissant aux télomères en fonction des phases du cycle sont illustrés. Les points d'interrogation représentent le manque d'information sur la localisation de la télomérase. Adapté de (Gilson & Geli, 2007).

Il faut noter cependant que ce modèle d'activation locale de la télomérase sur les télomères les plus courts a été déterminé par des études indirectes comme le CHIP et que des études directes sur ce mécanisme d'activation n'ont pas été réalisées *in vivo* (voir section Résultats, Chapitre 2).

Comme souligné sur la figure 24, il existe certaines étapes où la télomérase n'est pas stablement ancrée aux télomères. En phase S précoce, pendant la mitose et suite à l'action de Pif1p en fin de phase S, la télomérase est libérée des télomères. Comme aucune visualisation directe de la télomérase *in situ* n'a été réalisée, la localisation intracellulaire de cette enzyme lors de ces étapes reste inconnue. Ce n'est qu'au cours des années 2000 que différentes études visant la détection *in situ* des composants de la télomérase chez les mammifères et chez la levure ont été entreprises.

## **7. Localisation intracellulaire des composants de la télomérase chez les mammifères.**

L'équipe des Dr Terns et Kiss se sont intéressées à la localisation intracellulaire de l'ARN *hTR*, dans différents types cellulaires humains, en utilisant des techniques de *FISH* (Jady et al, 2006; Tomlinson et al, 2008; Venteicher et al, 2009). Les auteurs ont montré que *hTR* se regroupe en un à cinq foci dans les cellules humaines cancéreuses (Fig. 25) et que ces foci sont absents dans les cultures primaires qui n'expriment pas ou très peu de télomérase, suggérant que le regroupement en foci est dépendant de la présence de la sous-unité hTERT (Zhu et al, 2004). Certains foci colocalisent avec la coïline et la protéine TRF2, un marqueur utilisé pour déterminer la position des corps de Cajal *in situ* et un marqueur de position des télomères, respectivement (Jady et al, 2006).



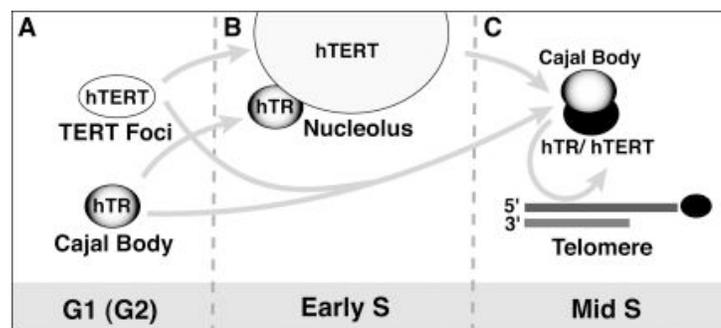
**Figure 25 : Hybridation *in situ* dirigée contre l'ARN *hTR* dans les cellules HeLa en fonction du cycle cellulaire.**

Le marquage dirigé contre la coïline montre la position des corps de Cajal. DAPI, marqueur de l'ADN. On peut visualiser un processus complexe de trafic intranucléaire en fonction du cycle cellulaire. Tiré de (Tomlinson et al, 2006).

L'expression de façon artificielle de hTERT dans des cellules humaines normales conduit à la formation de foci de *hTR* qui colocalisent avec les corps de Cajal. Les corps de Cajal seraient donc importants soit pour l'assemblage, soit pour la régulation de l'activité télomérase humaine (Tomlinson et al, 2008). De plus, les auteurs montrent, par

immunofluorescence, que hTERT peut être localisée dans les corps de Cajal, même si la majorité de hTERT se localise dans le nucléole (Etheridge et al, 2002; Tomlinson et al, 2006). Cette localisation nucléolaire pourrait participer à un mécanisme de protection des génomes. En effet, l'irradiation aux rayons  $\gamma$  d'une cellule transfectée par hTERT-GFP montre une accumulation de cette protéine dans le nucléole, post-irradiation (Wong et al, 2002). Il a été proposé que ce changement de localisation est le reflet d'un mécanisme qui va empêcher la compétition entre l'ajout de nouveaux télomères aux cassures double brin et la réparation par RH ou *NHEJ* (Makovets & Blackburn, 2009). Ce type de relation entre télomérase et réponse aux dommages à l'ADN a également été étudié dans notre laboratoire et nous proposons un mécanisme similaire (voir section perspective).

La protéine hTERT est activement échangée entre le nucléole et des foci distincts dans le nucléoplasme des cellules. Cependant, l'interdépendance entre la localisation de *hTR* et hTERT reste mal comprise. Les auteurs proposent un modèle de la localisation de *hTR* et hTERT en fonction du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses (Fig. 26) (Tomlinson et al, 2006).



**Figure 26: modèle proposé de la localisation de *hTR* et hTERT en fonction du cycle cellulaire dans les cellules HeLa.**

Plusieurs sous compartiments nucléaires sont impliqués dans ce processus. Tiré de (Tomlinson et al, 2006)

Ce modèle souligne la dynamique très complexe de ces deux facteurs et propose un modèle élégant où la collaboration active entre nucléoles et corps de Cajal délivre la

télomérase pré-assemblée aux télomères. L'étude de Cristofari et coll. a montré que ce trafic intranucléaire est requis pour l'homéostasie des télomères puisque la mutation de la boîte CAB de *hTR*, qui empêche sa localisation aux corps de Cajal, s'accompagne d'une absence d'élongation des télomères (Cristofari et al, 2007). Même si la boîte CAB est importante pour la localisation intracellulaire de *hTR*, elle n'est pas requise pour son assemblage en complexe RNP (Trahan & Dragon, 2009). Néanmoins, ces études n'ont pas identifié quels facteurs lient la boîte CAB et sont responsables du recrutement des scaARN et de *hTR* aux corps de Cajal.

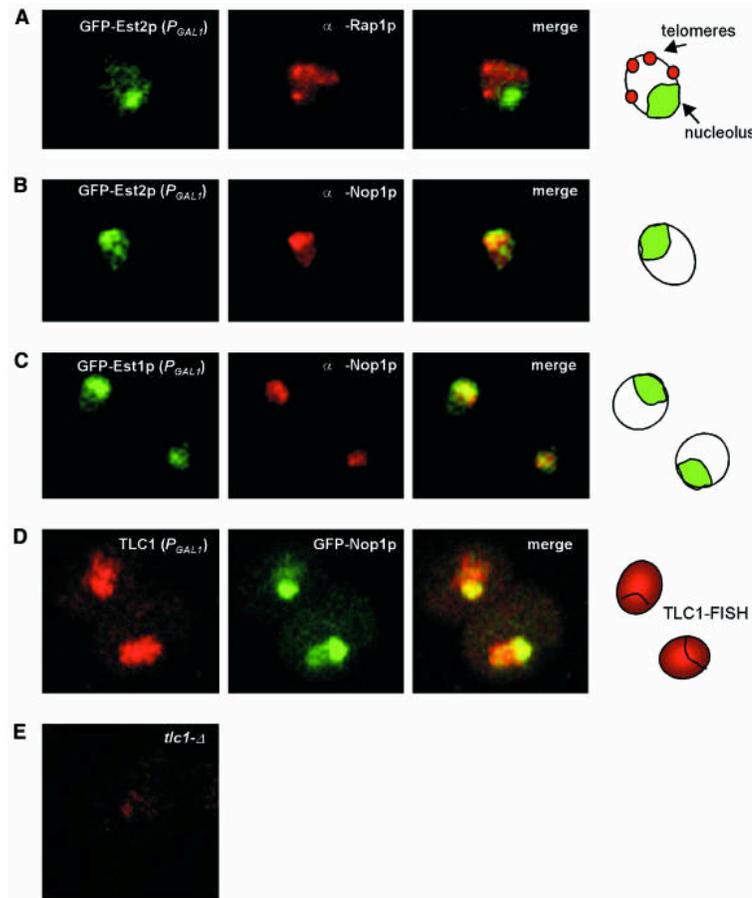
L'équipe du Dr Steitz a identifié la protéine WDR79 comme étant capable de lier la boîte CAB de *hTR* (Tycowski et al, 2009). Ils ont pu montrer que WDR79 interagit *in vivo* avec *hTR* et que cette protéine est localisée dans les corps de Cajal. Parallèlement, l'équipe du Dr Artandi a également identifié cette protéine comme étant capable de co-immunoprécipiter avec *hTR*, hTERT et la dyskérine. Ils ont pu montrer que WDR79 (aussi appelée TCAB1) est requise pour la localisation de *hTR* aux corps de Cajal, suggérant le fait que cette protéine est en partie responsable de la localisation intracellulaire de *hTR* (Venteicher et al, 2009).

## **8. Localisation intracellulaire des composants de la télomérase chez la levure.**

Malgré le grand nombre d'études biochimiques sur les facteurs impliqués dans le recrutement de la télomérase aux télomères, très peu d'études cytologiques ont été réalisées chez *S.cerevisiae*. Ces études étaient en général impossibles en condition endogène à cause de la très faible concentration des sous unités de la télomérase (vingt neuf molécules par cellule pour l'ARN *TLC1* (Mozdy & Cech, 2006), cent protéines pour Est2p (communication personnelle Dr Wellinger)). De ce fait, les deux seules études de

localisation disponibles ont été réalisées en conditions de surexpression (Ferrezuelo et al, 2002; Teixeira et al, 2002). Cette surexpression, même si elle peut être informative, ne représente pas le comportement de la forme endogène de la télomérase.

En 2002, l'équipe du Dr Lingner a publié un article montrant la localisation de composants de la télomérase en condition de surexpression (Teixeira et al, 2002). Ils ont utilisé le promoteur inductible pGal qui induit une très forte expression lorsque les cellules poussent en galactose. En utilisant cette technique et en réalisant une expérience de FISH pour détecter la localisation de l'ARN *TLC1* et d'immunofluorescence pour détecter la position de Est2p et Est1p, les auteurs ont pu montrer que les composants protéiques de la télomérase s'accumulent dans le nucléole des cellules en conditions de surexpression (Fig. 27). L'ARN *TLC1*, quant à lui, montre une localisation à la fois dans le nucléoplasme et dans le nucléole en condition de surexpression.



**Figure 27 : Les protéines Est s'accumulent dans le nucléole et l'ARN *TLC1* s'accumule dans le noyau en condition de surexpression.**

Localisation des protéines Est2p-GFP (A, B), Est1p-GFP (C) en condition de surexpression (pGal) chez *S.cerevisiae*. D : FISH dirigé contre l'ARN *TLC1* surexprimé. E : contrôle négatif du *FISH*. Tiré de (Teixeira et al, 2002).

Cependant, les auteurs ont fait une découverte très intéressante dans cet article. En fusionnant la séquence de l'ARN *TLC1* avec un gène rapporteur de prototrophie (*URA3*), les auteurs ont observé que les cellules étaient capables de pousser sur des géloses dépourvues d'uracile. Comme la traduction des protéines intervient dans le cytoplasme des cellules, les auteurs suggèrent que l'ARN *TLC1* est capable d'être exporté dans le

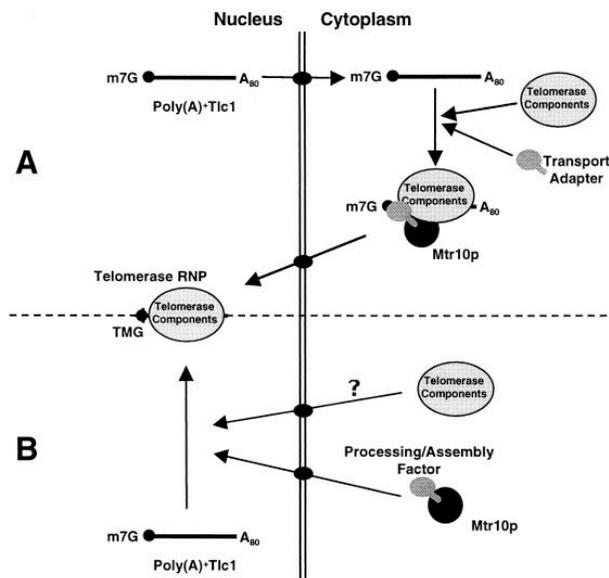
cytoplasme des cellules. Cependant, les auteurs ne peuvent pas exclure le fait que cet export nucléaire soit dépendant de la présence de l'ORF d'*URA3*. Pour visualiser le mécanisme d'import/export de l'ARN *TLC1*, les auteurs ont réalisé des essais de formation d'hétérokarya. Un hétérokaryon se forme normalement au cours de la fusion cellulaire lors de la formation de la première cellule diploïde au cours du croisement de deux cellules haploïdes. La fusion nucléaire est contrôlée par différents facteurs protéiques notamment par l'intervention des protéines de la famille *KAR* (*defective in KARyogamie*). Un des mutants *Kar*, *kar1-1*, autorise la fusion des deux cellules mais va empêcher la caryogamie en maintenant la forme hétérokaryonique (Conde & Fink, 1976). Ce système peut donc être utilisé pour déterminer les capacités de trafic nucléo-cytoplasmique de composés cellulaires. Cette technique a été employée pour déterminer les capacités de trafic de différents ARN chez la levure et peut également être employée chez l'humain (la fusion cellulaire est induite par la présence de polyéthylène glycol).

Les auteurs ont donc utilisé cette technique pour déterminer les capacités de trafic nucléo-cytoplasmique de l'ARN *TLC1* en condition de surexpression. En utilisant cette méthode, ils ont pu identifier dans une proportion non négligeable d'hétérokarya un trafic nucléo-cytoplasmique de l'ARN *TLC1* (Teixeira et al, 2002). Cependant, cette étude a été controversée due au long temps d'attente nécessaire à l'induction de *TLC1* (Hopper, 2006). Cette induction a été réalisée 12h après croisement.

Les auteurs suggèrent donc pour la première fois que la biogenèse et la maturation de la télomérase interviennent dans différents compartiments cellulaires comme le nucléole et le cytoplasme, même si les facteurs responsables de ce trafic n'ont pas été identifiés.

Deux mois plus tard, un article du laboratoire de Bruce Fitcher montre l'implication de la protéine Mtr10p dans le trafic nucléo-cytoplasmique de l'ARN *TLC1* (Ferrezuelo et al, 2002). Cette découverte a comme point de départ la mesure de la longueur des télomères dans des cellules délétées pour *MTR10*, un gène codant pour une karyophérine impliquée dans le trafic nucléo-cytoplasmique. Ils ont pu observer un raccourcissement des télomères

lorsqu'ils délètent cette importine non essentielle. Les auteurs proposent une interaction génétique avec *TLC1*, puisque la surexpression de cet ARN rétablit une longueur normale des télomères. La détection de l'ARN *TLC1* surexprimé a montré que cet ARN s'accumule dans le cytoplasme des cellules après délétion du gène *MTR10*. Les auteurs proposent donc deux modèles distincts de l'importance de Mtr10p dans la maturation et le trafic de la télomérase (Fig. 28).



**Figure 28 : modèle proposé de la localisation de l'ARN *TLC1* en condition de surexpression chez *S.cerevisiae*.**

Les auteurs ne peuvent cependant pas différencier les deux modèles possibles. En A, l'ARN *TLC1* ferait la navette entre le noyau et le cytoplasme en étant réimporté par Mtr10p. En B, Mtr10p serait important pour l'import nucléaire d'un facteur de rétention ou de biogenèse de l'ARN *TLC1*. Tiré de (Ferrezuelo et al, 2002).

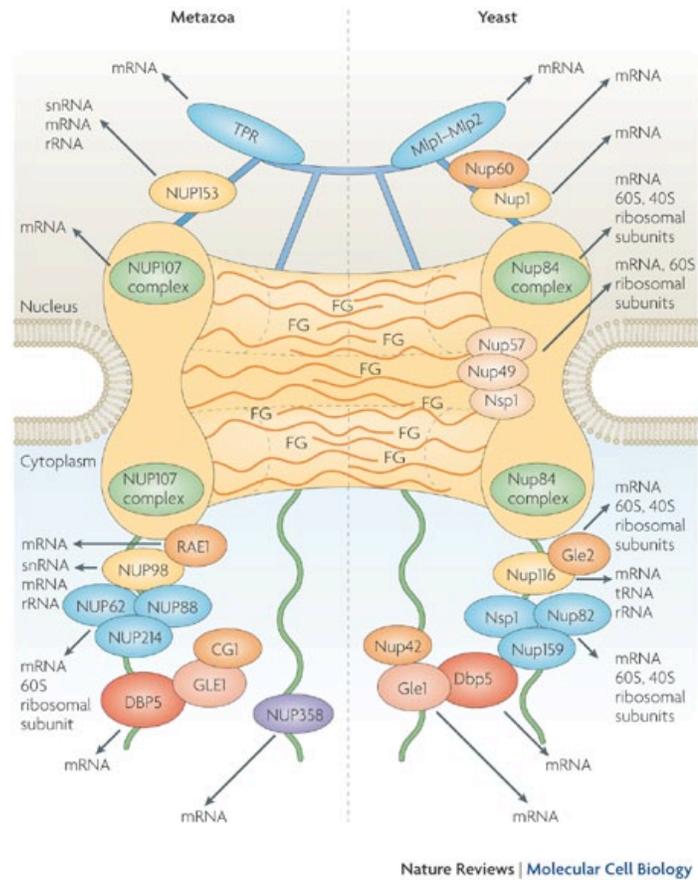
Ces deux études suggèrent pour la première fois que l'ARN *TLC1* serait capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Néanmoins, comme ces études utilisent des systèmes de surexpression, le trafic nucléo cytoplasmique de la forme endogène de l'ARN *TLC1* est inconnu.

## 9. Trafic nucléo-cytoplasmique des ARN

Si on considère la taille attendue d'un complexe télomérase contenant l'ARN *TLC1* (19,3S ; 670kDa) (Lingner et al, 1997b), cette taille est bien plus importante que la limite d'exclusion du pore nucléaire pour des molécules diffusives (60kDa) (Kohler & Hurt, 2007). Il est donc fortement probable que l'ARN *TLC1* utilise un système de transport actif dépendant de facteurs de transports (exportines et importines).

Le trafic nucléo-cytoplasmique de grosses molécules implique la liaison sur la molécule à exporter, appelée cargo, de facteur requis pour l'export/import. Ces facteurs sont composés d'adaptateurs, appelés karyophérines, faisant le lien entre le cargo et le moteur moléculaire Ran (Moore & Blobel, 1993). Ran est présent sous deux formes, une forme liée au GTP dans le noyau et une forme liée au GDP dans le cytoplasme. Ce gradient nucléo-cytoplasmique de Ran s'assure de la directionnalité du transport (Gorlich & Mattaj, 1996; Izaurralde et al, 1997).

Il existe deux types de karyophérines : les importines, impliquées dans l'import des cargos du cytoplasme vers le noyau, et les exportines, impliquées dans l'export du noyau vers le cytoplasme. Le transport nucléo-cytoplasmique dépend du passage de l'enveloppe nucléaire. Ce transit s'effectuera dans le complexe de pore nucléaire (NPC), seul contact entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques (Fig. 29).



**Figure 29 : illustration de la composition du NPC chez la levure et chez les mammifères.**

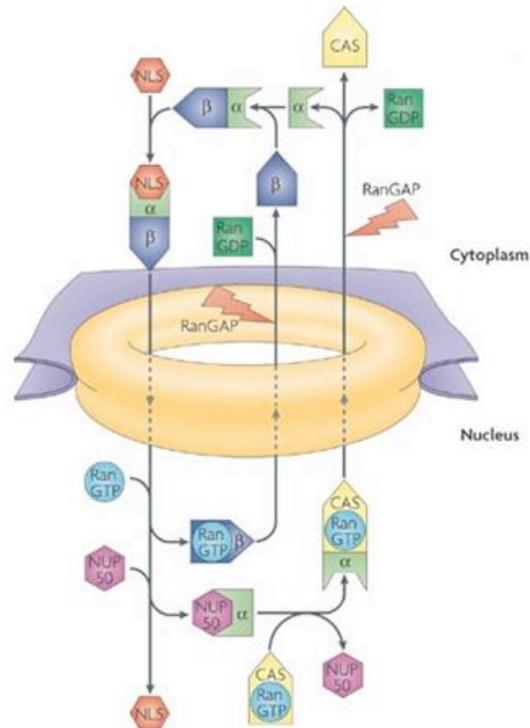
La fonction des protéines dans l'export est indiquée. Tiré de (Kohler & Hurt, 2007).

Le NPC est un complexe multiprotéique inclus dans l'enveloppe nucléaire. Le domaine central est symétrique et est accompagné d'un anneau cytoplasmique et nucléaire. Le pore nucléaire est formé de trente nucléoporines. Parmi celles-ci, les nucléoporines à motif FG sont retrouvées dans l'anneau central et fonctionnent directement dans le processus de trafic en interagissant directement avec les récepteurs de transport (Rexach & Blobel, 1995; Rout et al, 2000). Du fait de leur présence intégrale au cœur des pores

nucléaires, les Nup à motif FG sont des marqueurs utilisés en immunofluorescence afin de visualiser la position de l'enveloppe nucléaire (voir section Résultats, Chapitre 1). Certaines nucléoporines sont localisées de façon asymétrique sur le NPC et fonctionnent spécifiquement dans l'export de cargos de natures différentes. Par exemple, la protéine Nsp1p est impliquée dans l'export des sous-unités ribosomiques mais pas dans l'export des ARNm (Gleizes et al, 2001).

## 9.1 Mécanisme général d'import nucléaire.

L'import nucléaire est contrôlé par une des familles de Karyophérines, appelées importines. Ces protéines lient des séquences NLS (Séquences de Localisation Nucléaire) sur les protéines localisées dans le noyau. Ces NLS peuvent être de nature variable mais sont en général riches en lysines. Ils existe 11 importines chez la levure *S.cerevisiae*, dont l'importine Mtr10p (Revue dans (Wozniak et al, 1998). Cette importine est impliquée dans l'import de protéines de liaison à l'ARN (homologue de l'importine SR chez l'humain) (Kataoka et al, 1999). Les importines se fixent directement ou indirectement sur les cargo par l'intermédiaire d'un adaptateur (ex : importine  $\alpha$ ). La fixation de l'importine  $\alpha$  et  $\beta$  sur le cargo dans le cytoplasme va entraîner sa translocation dans le noyau au travers du NPC (Fig. 30). La présence d'une forte concentration en Ran-GTP dissocie le complexe et les importines sont recyclées vers le cytoplasme.



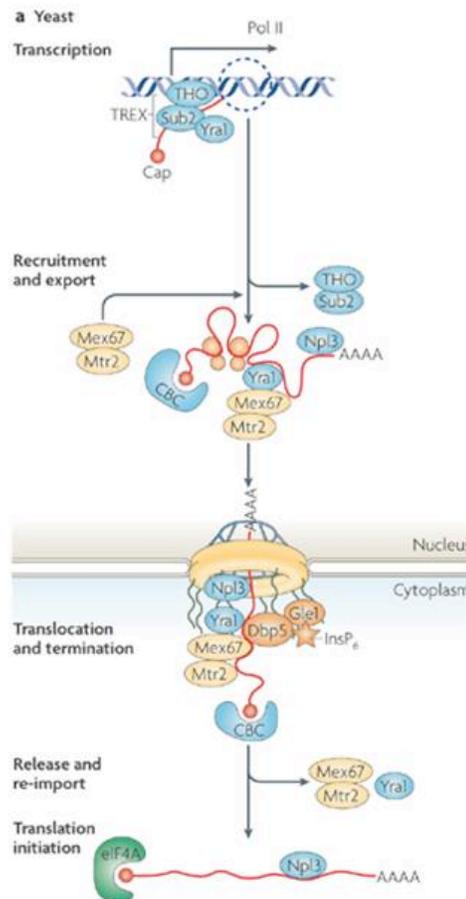
**Figure 30 : mécanisme général de l'import nucléaire des protéines.**

Les différentes étapes du transport ainsi que le recyclage des importines sont indiqués. Tiré de (Kohler & Hurt, 2007).

## 9.2 Mécanisme général d'export des ARN.

Les ARNm vont être exportés par une voie dépendante de la protéine Mex67p et de son facteur associé Mtr2p (Segref et al, 1997). Suite à l'assemblage co-transcriptionnel du complexe TREX sur l'ARNm naissant, une protéine de liaison à la coiffe (CBC) et la protéine Yra1p collaborent afin de recruter Mex67p/Mtr2p (Reed & Hurt, 2002; Strasser et al, 2002; Zenklusen et al, 2002). Ce complexe transite à travers le NPC et est libéré par

l'hélicase Dbp5p ancrée sur la face cytoplasmique du NPC (Tseng et al, 1998). La mRNP exportée est ensuite traduite (Fig. 31).



**Figure 31 : export des ARNm chez *S.cerevisiae*.**

Tiré de (Kohler & Hurt, 2007)

Les ARNr vont être exportés par une voie dépendante de l'exportine Crm1p, même si certaines études récentes impliquent également la participation de Mex67p (Moy & Silver, 1999; Yao et al, 2007). La grande sous-unité ribosomique va être exportée par la

liaison de Nmd3p qui recrute Crm1p (Gadal et al, 2001). L'export de la petite sous-unité ribosomique est également dépendante de Crm1p et de la protéine Rps15p (Leger-Silvestre et al, 2004). Crm1p exporte la majorité des protéines nucléaires contenant une séquence NES (Séquence d'Export Nucléaire) en général riche en Leucine et Valine.

Alors que les ARNm et les ARNr ont une localisation terminale dans le cytoplasme, d'autres RNP font la navette entre ces deux compartiments. En effet, les ARNt exportés par l'exportine-t, et les snARN exportés par hCRM1 chez l'humain, possèdent un mouvement rétrograde vers le noyau (Hopper, 2006; Shaheen & Hopper, 2005; Takano et al, 2005). La présence de trafic nucléo-cytoplasmique pour les snARN de levure a été suggérée mais aucune preuve directe n'a été apportée (Olson & Siliciano, 2003).

Une technique couramment employée dans la dissection des mécanismes impliqués dans l'export nucléaire des ARN est le *FISH*. Cette technique repose sur l'hybridation *in situ* d'une sonde fluorescente afin de détecter la position précise de l'ARN cible. Même si cette technique est très puissante pour détecter l'accumulation d'ARN dans un compartiment cellulaire, elle ne donne aucune information sur la dynamique de cet ARN *in vivo*. Pour résoudre ce problème, de nouveaux systèmes de localisation en cellules vivantes ont été créés, notamment par l'utilisation du système MS2-GFP.

## **10. Description du système MS2-GFP pour le suivi des ARN *in vivo*.**

Le suivi des ARNm en cellule vivante a tout d'abord été réalisé en étiquetant des protéines de liaison à l'ARN avec l'étiquette fluorescente GFP. Cette méthode permettait la détection de particules qui contenaient des ARNm *in vivo*. Cependant, les protéines de liaison

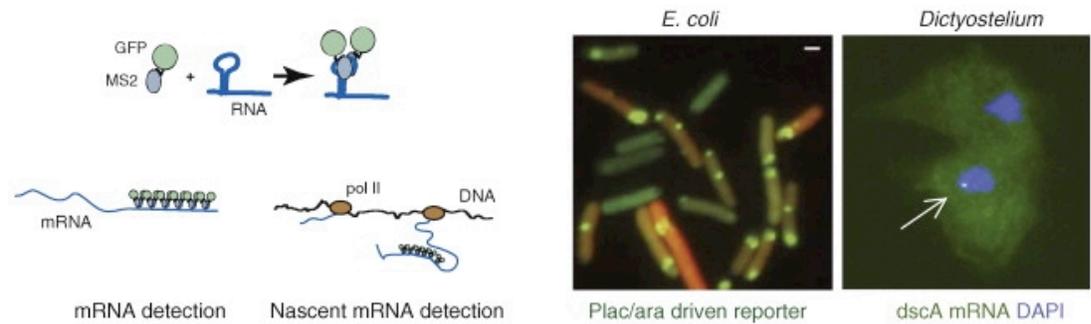
à l'ARN peuvent se lier sur différentes cibles et aucune technique directe de visualisation de l'ARN *in vivo* n'avait été développée.

Le système MS2 est dérivé du bactériophage MS2, un virus bactérien parasite intracellulaire obligatoire. Ce phage est un phage lytique, sa réplication massive va induire la lyse de la bactérie et la libération de nouvelles particules virales. C'est un bactériophage contenant un génome ARN infectant *E.coli* (Vinuela et al, 1967). Sans entrer dans les détails des mécanismes de sa réplication, le phage MS2 nécessite la liaison de la protéine de liaison MS2 dans les étapes tardives de sa biogénèse. En effet, la traduction de l'ARN viral va être inhibée par la liaison de la protéine MS2 sur une tige boucle MS2 localisée en 5' de l'ARN (Bernardi & Spahr, 1972). La fixation de cette protéine va inhiber la traduction de la réplicase et entraîner l'encapsidation du génome phagique. L'affinité de la protéine MS2 pour la tige boucle MS2 est très forte ( $K_d=10^{-9}M$ ) (Lim & Peabody, 1994). La liaison de la protéine MS2, qui est un dimère obligatoire, va également induire sa multimérisation et la formation de la capsid du phage (Revue dans (Keryer-Bibens et al, 2008). Afin d'utiliser ce système en laboratoire, la tige boucle MS2 et la protéine MS2 ont été modifiées. Des mutations augmentant l'affinité de la protéine MS2 pour la tige boucle ont été générées à la fois dans la séquence ARN mais également dans la protéine MS2. De plus, la séquence induisant la multimérisation de MS2 a été déléetée (boucle F-G). (Revue dans (Querido & Chartrand, 2008)).

La première utilisation du système MS2 a été réalisée dans le but de purifier des complexes ARN-protéines dans le laboratoire du Dr Marvin Wickens en 1990 (Bardwell & Wickens, 1990). Ce système a finalement été dérivé pour donner naissance à la technique de triple hybride chez la levure dans le même laboratoire (SenGupta et al, 1996).

En 1998, dans le laboratoire du Dr Singer, le Dr Bertrand et coll. ont réussi à adapter ce système afin de détecter la position d'ARN en cellules vivantes (Bertrand et al, 1998). Le système MS2-GFP repose donc sur l'insertion dans l'ARN cible de structure en tiges boucles MS2 qui vont être reconnues très spécifiquement par la protéine MS2

fusionnée à une protéine fluorescente (GFP) (Fig.32). La reconstitution *in vivo* du complexe MS2 mène à la détection de la RNP. Différents ARN ont pu être détectés en utilisant cette technique, dans une grande variété d'organismes.



**Figure 32 : description du système MS2-GFP pour le suivi des ARN *in vivo*.**

A gauche : description du système MS2. A droite, exemple de détection *in vivo*. Tiré de (Larson et al, 2009)

Le premier ARN à avoir été détecté *in vivo* est l'ARNm *ASH1* contenant 6 tiges boucles MS2, chez la levure (Bertrand et al, 1998). Cet ARNm est un exemple d'ARNm localisé de façon asymétrique et le laboratoire du Dr Singer a pu le suivre de sa transcription jusqu'à son déplacement à l'extrémité du bourgeon des levures. Ce système est donc un atout pour détecter spécifiquement la position des ARN *in vivo*, et d'autres systèmes similaires ont été développés par la suite (Revue dans (Bao et al, 2009)). Le même laboratoire a également réussi à détecter des particules d'ARNm dans le noyau des cellules humaines en utilisant la même méthode. Dans cette étude, ils ont pu montrer que les ARNm libres adoptaient plusieurs comportements caractéristiques de molécules diffusives, à des vitesses proches de 500 nm/s (Shav-Tal et al, 2004a). Ils ont également pu visualiser dans certains cas un transport actif de ces molécules, où les particules dépassaient la vitesse de 1  $\mu\text{m/s}$  (Fusco et al, 2003). Le développement de telles techniques pour la détection *in vivo* de l'ARN *TLC1* offrirait un système de choix pour l'étude de la télomérase (voir section Résultat, chapitre 2).

## 11. Hypothèses et objectifs de travail.

Les étapes de recrutement de la télomérase aux télomères sont maintenant bien connues chez *S.cerevisiae*. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux étapes d'assemblage de la télomérase et comment son assemblage est relié au mécanisme de recrutement aux télomères. Sachant qu'il est possible que l'ARN *TLC1* endogène soit capable de trafic nucléo-cytoplasmique, il est probable que la télomérase s'assemble et soit maturée dans différents compartiments sub-cellulaires. Les études des laboratoires du Dr Lingner et Fitcher utilisaient des formes surexprimées de l'ARN *TLC1*, et aucune étude impliquant la détection de la forme endogène de composants de la télomérase n'a été réalisée. Ces deux travaux, même s'ils sont indicatifs, amènent plusieurs problèmes liés à la surexpression des composants de la télomérase. Dans le cas de l'ARN *TLC1*, on peut voir sur ces articles que la surexpression induit des défauts de maturation, ou une forme minoritaire poly-adenylée s'accumule dans les cellules. Cette modification pourrait fausser la localisation normale de l'ARN *TLC1* en titrant un ou plusieurs facteurs impliqués dans sa biogénèse. Les facteurs impliqués dans le trafic de cet ARN n'ont pas été identifiés, même s'il a été suggéré que l'ARN *TLC1* pouvait faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. De plus, nous ne savons pas si les composants endogènes de la télomérase sont capables d'un tel trafic ou si cet effet est lié à la présence massive d'ARN à l'intérieur du noyau des cellules, qui pourrait induire une fuite vers le cytoplasme.

A mon arrivée au laboratoire, la technique de *FISH* sur l'ARN *TLC1* venait d'être mise au point par le travail de Mme Catherine Olivier et les premiers travaux sur la localisation de l'ARN *TLC1* dans des cellules sauvages avaient abouti. Nous avons donc développé avec succès cette technique afin de disséquer les étapes de la biogénèse et de l'assemblage de la télomérase *in situ* chez *S.cerevisiae*.

Dans un deuxième temps, nous avons pu développer une méthode afin de suivre la position de l'ARN *TLC1* dans des cellules vivantes, par microscopie. Les objectifs de ce travail étaient de vérifier le comportement de cet ARN *in vivo* et de le comparer aux résultats obtenus par des études indirectes comme le *FISH* ou le *ChIP*.

L'utilisation de deux méthodes différentes pour étudier le trafic de l'ARN *TLC1* a été une approche extrêmement puissante pour littéralement disséquer la maturation et le comportement de la forme active de la télomérase *in situ* et *in vivo*.

## **METHODES**

Les méthodes de FISH et de suivi d'ARN en cellules vivantes ont été décrites en détails dans *Gallardo F and Chartrand P, Methods in molecular biology, 2010*, présenté en annexe.

## **1. Souches et plasmides.**

Les souches de levure et les plasmides sont présentés en annexe. Le protocole de transformation est adapté de Gietz (Gietz & Woods, 2002). La génération de mutants de délétion ou d'intégration a été réalisée par le protocole de Longtine (Longtine et al, 1998).

## **2. Méthodes utilisées dans le chapitre 1.**

### **2.1 Fixation des cellules :**

La méthode de fixation des cellules a été décrite précédemment (Chartrand et al, 2000). Toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées à 4°C ou mentionné si différent. Les cellules ont été inoculées dans des milieux sélectifs appropriés jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase exponentielle de croissance ( $DO_{600}$  de 0.2–0.6) et fixées en ajoutant du paraformaldéhyde à 4% final (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) pendant 45 min à température pièce. Les cellules ont été récoltées par centrifugation 5 min à 3400 r.p.m. et lavées deux fois dans 10 ml de tampon B 1X froid (1.2 M sorbitol, 0.1 M phosphate de potassium (pH 7.5)). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 mL de tampon B 1X contenant 20 mM vanadylribonucleoside complex (VRC), 28 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.06 mg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 5  $\mu$ g/ml de pepstatine, leupeptine, aprotinine et 120 U/ml RNA guard (Sigma) et transférées dans un eppendorf contenant de l'oxalyticase déshydratée produite à partir d'une souche d' *Escherichia coli DH5 $\alpha$* . Les cellules ont été incubées à 30°C pour 16–18 min afin de permettre la digestion de la paroi et récoltées par centrifugation 4 min à 3400 r.p.m. Les cellules ont été lavées une fois dans 1 ml de tampon B 1X et resuspendues dans 750  $\mu$ l de tampon B 1X. 100 $\mu$ L de sphéroplaste ont été déposés

sur des lamelles de microscopie recouvertes de poly-L-lysine. Les cellules ont été incubées à 4°C pour 30 min pour favoriser l'adhésion, lavées une fois avec du tampon B 1X et déshydratées dans de l'éthanol 70% DEPC. Les cellules sont conservées à -20°C jusqu'à la réalisation des expériences de microscopie.

## **2.2 Hybridation *in situ* en fluorescence.**

Le protocole de *FISH* utilisant des sondes ADN a été décrit précédemment (Chartrand et al, 2000). A la suite de la fixation, les cellules ont été réhydratées avec deux lavages de 2 X SSC pendant 5 min à température pièce. Les lamelles ont été incubées deux fois dans du 2 X SSC 40% formamide pour 5 min à température pièce. En parallèle, 10 µl du mélange de sondes dirigées contre l'ARN *TLC1* (1 ng/µl) a été mélangé à 4 µl d'une solution à 5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon et d'ARNt de *E. coli* (ratio1/1, Sigma). Le mélange a été lyophilisé dans un *speed-vac*. Le culot a été resuspendu dans 12 µl d'une solution à 80% formamide et 10 mM phosphate de sodium (pH 7.0). La solution de sonde a été chauffée à 95°C pendant 5 min et 12 µl d'une solution de 4 X SSC, 20 mM VRC, 4 µg/µl ASB et 50 U de RNA guard ont été ajoutés. La solution de sonde a été déposée sur un parafilm et les lamelles ont été placées sur les gouttes de sonde la face contenant les cellules vers le bas. L'hybridation a été réalisée sur la nuit à 37°C. A la suite de l'hybridation, les lamelles ont été lavées 2 fois avec 8mL de 2 X SSC 40% formamide 15 min à 37°C, une fois avec 8 mL de 2 X SSC 0.1% Triton X-100 et 2 fois avec 8mL de 1 X SSC. Les lamelles ont finalement été incubées dans 8 mL de 1 X PBS contenant du diamidino phénylindole (DAPI) pendant 2 min et montées sur des lames de microscopes à l'aide de milieu de montage (86% glycérol, 1 mg *p*-phénylène diamine, 1 × PBS).

## **2.3 Protocole couplé de *FISH* et d'immunofluorescence.**

Le protocole pour la réalisation séquentielle du *FISH* et d'une immunofluorescence a été réalisé comme précédemment décrit (Chartrand et al, 2000). A la suite du dernier lavage de 1 X SSC du protocole de *FISH*, les cellules ont été incubées dans du 1 X PBS

0.1% BSA, 1 X PBS 0.1% BSA 0.1% NP-40 (Sigma) et 1 X PBS 0.1% BSA séquentiellement pour 5 min à température pièce. L'anticorps primaire a été dilué à la concentration adéquate (de 1/400 à 1/2500) dans du 1 X PBS contenant 0.1% BSA, 20 mM VRC et 120 U/ml RNA guard. L'anticorps Mab414  $\alpha$ FG Nup (Abcam) a été utilisé pour détecter la position des pores nucléaires. L'anticorps 9E10 anti-Myc (Roche) a été utilisé pour détecter la position de Rap1p. L'hybridation a été réalisée soit pendant 2h soit toute la nuit, à 37 et 4°C, respectivement. Les cellules ont ensuite été rincées séquentiellement avec 8mL de 1 X PBS 0.1% BSA, 1 X PBS 0.1% BSA 0.1% NP-40 et 1 X PBS 0.1% BSA pendant 15 min à température pièce. L'anticorps secondaire a été dilué dans du 1 X PBS 0.1% BSA, 20 mM VRC et 120 U/ml RNA guard (typiquement 1/1000) et incubé à température pièce pendant 60–90 min dans le noir. Les cellules ont été lavées avec 8mL de 1 X PBS 0.1% BSA, 1 X PBS 0.1% BSA 0.1% NP-40 et 1 X PBS 0.1% BSA pendant 15 min à température pièce. Les lamelles ont finalement été incubées dans 8mL de 1 X PBS contenant du diamidino phenylindole (DAPI) pendant 2 min et montées sur des lames de microscopes.

## 2.4 Acquisition des images, déconvolution et post-traitement.

Toutes les images de *FISH* ont été acquises en utilisant un microscope Nikon Eclipse E800 à épifluorescence équipé avec un objectif Nikon  $\times$  100 DIC H (1.4 NA) et une caméra Photometrics CoolSNAP fx CCD. Les images ont été prises à l'aide du programme Metamorph et traitées avec Adobe Photoshop. Pour les expériences de déconvolution, les images ont été importées dans le programme AutoDeblur et le bruit de fond a été soustrait par autodétection. La déconvolution a été réalisée avec l'option *PSF theoretical algorithm*, allant de 10 à 60 itérations pour chaque canal. Les canaux déconvolués ont ensuite été superposés et le niveau de colocalisation a été déterminé avec Metamorph. Le très faible niveau d'expression pour l'ARN *TLC1* ne permet pas l'utilisation de script Photoshop pour le traitement des images et les niveaux doivent être ajustés manuellement.

## 2.5 Essai de trafic nucléocytoplasmique par formation d'hétérokarya.

La souche *tlc1* et *TLC1 kar1-1* ont poussées en YEPD jusqu'à une  $DO_{600}$  de 0.5. 25 mL de culture *tlc1* a été croisée avec 12.5 ml de culture *TLC1 kar1-1* dans 150 mL de YEPD. Après 5 h de croisement, les cellules ont été fixées et le *FISH* a été réalisé comme décrit précédemment.

Comme contrôle négatif, la souche *kar1-1* a été transformée avec le plasmide pRL134 (pGal-*LOC1-6xMyc*; don du Dr Roy Long). Les transformants ont été sélectionnés et ont poussé toute la nuit dans du milieu minimum contenant 2% raffinose à 30°C. Les cellules ont été diluées à une  $DO_{600}$  de 0.2 dans 50 ml de milieu minimum contenant 2% galactose. L'induction de Loc1p-Myc a été faite pendant 2h à 30°C. Après induction, l'expression de Loc1-Myc a été réprimée en ajoutant du glucose à 2% final pendant 2h. Les cellules *kar1-1+pRL134* ont été croisées avec les cellules *tlc1* comme décrit précédemment.

## 2.6 Analyse de l'expression des ARN par RT-PCR quantitative

Les ARN totaux des cellules ont été extraits à l'aide du protocole *yeast RNA miniprep* décrit précédemment (Schmitt et al, 1990). 2 µg d'ARN totaux a été rétrotranscrit en utilisant des amorces spécifiques pour l'ARNm *ACT1*, le snARN *UI-* et l'ARN *TLC1*. L'ARN total a été resuspendu dans de l'eau DEPC contenant 2 pmol d'amorces spécifiques et 1 µl de dNTP à 25 mM, de l'eau DEPC a été ajouté pour qsp 12 µl. Les échantillons ont été chauffés 5min à 65°C et refroidis rapidement sur glace. Un volume de 4 µl de tampon 5 × RT-PCR (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 2 µl de 1 M DTT et 1 µl d'RNA guard ont été ajoutés. Les échantillons ont été préchauffés 2 min à 42°C et 1 µl (200 U) de Revert-aid M-MuLV-RT a été ajouté pour démarrer la réaction (42°C pendant 50 min). Les niveaux d'expression des différents gènes cibles ont été déterminés en utilisant des amorces de l' *Universal Probe Library* (Roche Scientific; <https://www.roche-applied-science.com>). Des PCR dans des plaques de 384 puits ont été

effectuées en utilisant 2 µl d'ADNc (50 ng), 5 µl de *TaqMan PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µM de chaque amorce et 1 µM de l' *Universal TaqMan probe* dans un volume total de 10 µl. Le système ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems) a été utilisé pour détecter l'amplification (10 min à 95°C, 40 cycles de 15s à 95°C et 1 min à 60°C). Toutes les réactions ont été réalisées en triplicata et les valeurs moyennes ont été utilisées pour quantification. L'ARN *ACT1* ou *snR19* (snARN *U1*) a été utilisé comme contrôle endogène. La quantification relative des gènes cibles a été déterminée en utilisant la méthode rCT. Brièvement, la valeur de  $C_t$  (threshold cycle) des gènes cibles a été normalisé par rapport au contrôle endogène (*ACT1* ou *snR19*) ( $rCT = C_t \text{ cible} - C_t \text{ ACT1 ou snR19}$ ) et comparés.

## **2.7 Immunoprécipitation des ARN contenant des coiffes tri-méthylées.**

Les ARN totaux des cellules ont été extraits à l'aide du protocole *yeast RNA miniprep* décrit précédemment (Schmitt et al, 1990). 60 µg d'ARN totaux a été resuspendu dans 150 µl de tampon HEPES et 2 µl d'anticorps anti-TMG (Calbiochem) ont été ajoutés. Les extraits ont été incubés sur une roue à 4°C pendant 2 h. A la suite de l'incubation, 40 µl de bille de protéine A Sepharose ont été ajoutés et l'immunoprécipitation a été incubée à 4°C sur une roue pour 2 h. Les extraits ont été centrifugés 4 min à 4500 r.p.m. à 4°C et lavés trois fois pendant 4 min avec une solution de lavage (25 mM HEPES (pH 7.5), 35 mM chlorure de potassium, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). 200 µl de tampon d'éluion (50 mM Tris (pH 8), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS) a été ensuite ajouté et incubé à 65°C pendant 15 min ou à 95°C pour 5 min. L'immunoprécipitât a été extrait par du phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol Le culot a été resuspendu dans 45 µl d'eau DEPC et 5 µl de tampon de digestion de la DNase I a été ajouté avec 1 µl de DNase I. Les échantillons ont été incubés 1h à 37°C pour éliminer la contamination par l'ADN. L'ARN a ensuite été extrait avec 1 volume de phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Le culot a été resuspendu dans 30 µl d'eau DEPC et 3 µl a été utilisé en RT-PCR. Le même protocole a été utilisé pour l'amplification des ARN totaux sans incubation avec l'anticorps et les billes, et 1,5 µl

d'ARN ont été utilisés en RT-PCR. L'amplification PCR des produits rétrotranscrits a été réalisée pendant 15, 20, 25 ou 30 cycles et analysée sur un gel d'agarose 1,5%.

### **3. Méthodes utilisées dans le chapitre 2.**

#### **3.1 Insertion des tiges MS2 dans la section 3' de *TLC1***

L'insertion de l'étiquette MS2 a été réalisée en utilisant 2 oligonucléotides complémentaires codant pour 2 tiges MS2 (comme décrit dans (Bardwell & Wickens, 1990)) mais contenant une mutation qui supprime le site de restriction PstI. 1.0 µg d'oligos (0.5 µg de chaque) ont été hybridés pendant 2h dans du tampon d'hybridation à 70°C (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). La réaction a ensuite été refroidie lentement jusqu'à température pièce. Le produit a été digéré 2h à 37°C avec PstI et NsiI. Les produits digérés ont ensuite été ligués dans le plasmide *pTLC1-TRP* digéré par NsiI et déphosphorylé. Le plasmide généré, *pTLC1-2xMS2*, a été vérifié par séquençage. L'insertion multiple des tiges MS2, jusqu'à *TLC1-10xMS2*, a été réalisée en répétant la même méthode.

#### **3.2 Test de complémentation**

La souche RWY11 a été transformée avec le plasmide *Ycp33-MS2-GFP* et *pRS314*, *pRS314 TLC1-WT* ou *pRS314 TLC1-10xMS2*. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu sélectif et re-striés jusqu'à 100 générations.

#### **3.3 Analyse de la longueur des télomères par Southern-blot**

Les cellules de chaque passage du test de complémentation ont poussé dans du milieu sélectif et l'ADNg a été extrait par la méthode des billes de verre (Revue dans (Hanna & Xiao, 2006)). 1 µg d'ADNg a été digéré avec l'enzyme de restriction XhoI et les produits de digestion ont été résolus sur gel d'agarose 0,6%. Après migration, les

échantillons ont été transférés sur une membrane de nylon par transfert par capillarité et hybridés avec une sonde de 300 pb contenant 280 pb de répétitions télomériques dérivées de *pYLPV* (Wellinger et al, 1993b). Les sondes d'hybridation radioactives ont été obtenues par amorçage aléatoire (Feinberg & Vogelstein, 1983). La longueur des télomères a été visualisée à l'aide d'un appareil Storm PhosphorImager (Storm 860, GE Healthcare).

### **3.4 Analyse de l'expression des ARN par Northern-blot**

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 10 mL de cellule en phase exponentielle de croissance. L'extraction a été réalisée par la méthode standard des billes de verre dans un appareil *Fast Prep*<sup>®</sup>-24 (MP Biomedicals). A la suite de la lyse des cellules et de l'extraction des acides nucléiques par phénol chloroforme, l'ARN a été précipité dans 3 volumes d'éthanol 100% et 2% d'acétate de potassium. Après resuspension du culot dans de l'eau DEPC, l'analyse par Northern blot a été réalisée comme précédemment décrit (Larose et al. 2007). Brièvement, 20 µg d'ARN totaux ont été résolus sur un gel 1% MOPS-agarose et transférés sur une membrane nylon Hybond-N+ (GE Healthcare). L'ARN a été visualisé soit à l'aide d'une sonde spécifique pour l'ARN *TLC1* (fragment de digestion NcoI-NsiI de *pRS314 TLC1WT*) soit une sonde spécifique pour l'ARN *ACT1*. L'analyse et la quantification des niveaux d'ARN ont été réalisés à l'aide du Storm PhosphorImager (Storm 860, GE Healthcare) et du programme ImageQuant (Molecular Dynamics), respectivement.

### **3.5 Extraction des protéines, immunoprécipitation et essai d'activité télomérase.**

Les extraits protéiques totaux ont été effectués comme précédemment décrits (Friedman & Cech, 1999) avec modification mineure. Brièvement, 1 litre de cellules poussées jusqu'à  $DO_{660nm}$  de 1 ont été culotées, lavées une fois avec de l'eau froide et une fois avec le tampon TMG (200 mM NaCl). Le culot cellulaire a ensuite été congelé dans de

l'azote liquide et la lyse a été réalisée en broyant le culot en présence de morceaux de glace sèche dans un moulin à café (Krupps). La poudre de cellule a ensuite été décongelée sur glace et 1 volume de tampon TMG (200 mM NaCl, 0.1 mM DTT, inhibiteur de protéases) a été ajouté. Après une étape de *pré-clearing* en centrifugeant 10 minutes à 15 000 g (4°C), un extrait S-100 a été réalisé en ultra-centrifugeant 2h à 100 000g (4°C). L'immunoprécipitation a été réalisée en utilisant 2 mg d'extrait protéique, soit avec des billes IgG sépharose (GE Healthcare) ou avec de la Protéine G sépharose (Roche).

L'immunoprécipitation IgG a été réalisée avec l'extrait protéique de NLYH15 comme précédemment décrit (Friedman & Cech, 1999). L'immunoprécipitation avec la Protéine G sépharose a été réalisée comme suit: 2 mg d'extrait protéique a été ajusté à 0.5% Tween-20 et de la RNasin a été ajoutée (40U/ml, Promega). Après incubation de 2-3 heures à 4°C avec 500 ng d'anticorps anti-GFP (Ac monoclonal de souris, Roche), 50 µl de Protéine G sépharose prélavée au TMG a été ajouté à l'extrait et la réaction a été poursuivie toute la nuit à 4°C avec agitation douce. Les billes IgG et Protéine G sépharose ont ensuite été lavées 2 fois avec 0.5 ml de tampon TMG (200 mM NaCl, 0.1 mM DTT, inhibiteur de protéases, 0.5 % Tween-20) et deux fois avec 0.5 ml TMG (0.1 mM DTT, inhibiteur de protéases, et RNasin (1 µl par 0.5 ml de TMG)). Les billes ont été resuspendues dans un volume (50 µl) de TMG (0.1 mM DTT, inhibiteur de protéases, et RNasin (1 µl par 0.5 ml de TMG)).

L'essai d'activité télomérase a ensuite été réalisé comme décrit (Friedman & Cech, 1999). L'élongation de l'amorce télomérique (5' – TAGGGTAGTAGTAGGG - 3') a été suivie pour déterminer l'activité télomérase. La visualisation et la quantification des produits a été obtenue à l'aide du Storm PhosphorImager (Storm 860, GE Healthcare).

### **3.6 Imagerie des cellules vivantes.**

L'imagerie multi-couleurs de cellules vivantes a été réalisée en utilisant un microscope confocal à disque tournant Leica DMI6000B motorisé équipé d'un objectif

100X Leica PL APO 1.4NA (1pixel=0,099nm). L'imagerie confocale a été réalisée à l'aide d'un laser à diode pour GFP/mCherry (491nm/25mW), pour CFP (440nm, 25mW) et des filtres de fluorescence GFP (520/35), mCherry (692/40) et CFP (483/32). Un équipement de contrôle de la température et un système de chauffage de l'objectif a été utilisé pour maintenir la température à 30°C. Les images ont été acquises par une camera Hamamatsu 9100 EM-CCD avec le *binning* à 1 (512\*512BT). L'acquisition des images a été réalisée avec le programme Volocity. Les temps d'exposition pour l'ARN *TLC1* ont été fixés à 200ms pour le suivi des particules et 400ms pour l'imagerie multi-couleurs (puissance laser à 100%, auto-contraste activé). Dans ces conditions, la phototoxicité est réduite puisque les cellules sont capables de pousser normalement après imagerie.

Pour le comptage des gros foci d'ARN *TLC1* (T-rex), les cellules ont été comptées sous un microscope Nikon E800 à épifluorescence équipé avec un objectif 100x Nikon DIC H (1.4NA). Au moins 50 cellules dans trois expériences indépendantes ont été comptées. Les phases du cycle cellulaire ont été déterminées par critère morphologique.

### **3.7 Suivi des particules de *TLC1*-GFP, quantification et calcul des paramètres physiques.**

Les piles d'images générés lors de l'acquisition ont été importées dans le programme Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) et la position des particules au cours du temps a été déterminée par le plug-in *Particle detector and tracker* avec les paramètres suivants: pour les petits foci de *TLC1*-RNA-GFP: Radius=2, CutOff=0, percentile entre 0,1 et 0,5, link=2, displacement=8. Pour les foci T-rex : Radius=3, CutOff=0, percentile=0,1, link=2, displacement=8. Toutes les pistes générées par le plug-in ont été regardées individuellement pour vérifier la précision du suivi des particules. Seulement les pistes supérieures à 13 étapes de déplacement ont été incluses dans l'analyse. Le nombre de particules, les déplacements analysés et les résultats sont présentés dans les Tables 1 et 2.

Comme Image J ne fournit que la position des particules a chaque temps (en X-Y), la vitesse et le *mean square displacement* ont été extraits par conversion mathématique dans le programme Excel. Les vecteurs de vitesse ont été calculés avec la formule:  $\vec{V} = \sqrt{[(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2]}$ . Après intégration des temps d'exposition et calibration des données, la vitesse est exprimée en  $\mu\text{m/s}$  dans les Tables 1 et 2 (min, max et moyenne).

Pour le calcul de MSD, les coordonnées en X-Y pour chaque temps ont été utilisées dans la formule:  $MSD = \sum_{0-i} \sqrt{[(x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2]}$  Après intégration des temps d'exposition et calibration des données, les MSD sont exprimés en  $\mu\text{m}^2$  dans les figures 63 et 65. Le calcul des coefficients de diffusion a ensuite été effectué en mesurant la pente moyenne initiale des courbes de MSD. Les coefficients de diffusion sont en  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  et présentés dans les Tables 1 et 2.

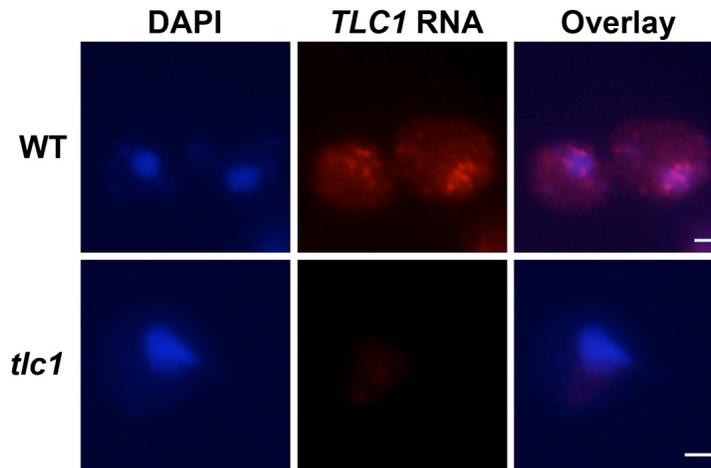
## **RESULTATS**

## **Chapitre 1 : détection de la localisation endogène de l'ARN *TLC1* par Hybridation *in situ* en fluorescence.**

Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans le journal *EMBO J* en mars 2008 (Gallardo et al, 2008). Madame Catherine Olivier est co-auteur de cet article et a réalisé les expériences des figures 36 (localisation dans  $\Delta est2$ ), 37 ( $\Delta yKu70$  et  $\Delta stem yKu$ ), 50 ( $\Delta mtr10$ ) et 53.

### **1.1 L'ARN *TLC1* se regroupe en 6 à 10 foci dans le noyau des cellules sauvages.**

Afin de déterminer la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1* en contexte sauvage, des cellules WT et  $\Delta TLC1$  ont été soumises au protocole de *FISH* et imagées sous un microscope à épi-fluorescence. Nous avons utilisé un mélange de cinq sondes dirigées contre l'ARN *TLC1*, chaque sonde contient idéalement cinq fluorophores Cy3 greffés sur des T modifiés (amino-allylés). Chaque sonde utilisée contenait une incorporation de fluorophores supérieure à trois.



**Figure 33 : Localisation de l'ARN *TLC1* en condition endogène dans des souches sauvages et  $\Delta$ *TLC1*.**

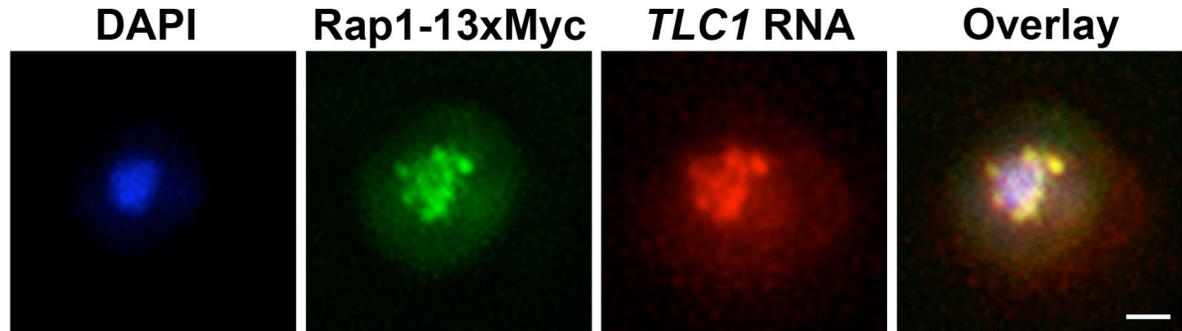
La souche  $\Delta$ *TLC1* ne montre aucun foci lors de la détection de l'ARN par *FISH*, indiquant que notre méthode est spécifique. L'ARN *TLC1* se regroupe en foci à l'intérieur des noyaux des cellules WT. Les mêmes niveaux ont été utilisés pour la génération des images. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1  $\mu$ m.

Le résultat montre que l'ARN *TLC1* ne se retrouve pas de façon diffuse dans les cellules mais se regroupe sous forme de foci localisés dans le noyau des cellules sauvages, visualisés par marquage au DAPI (Fig. 33). L'utilisation d'une souche  $\Delta$ *TLC1* montre la spécificité de notre expérience puisque aucun foci d'ARN *TLC1* n'est visualisable suite au *FISH*. De plus, un certain signal faible pour l'ARN *TLC1* est présent dans le cytoplasme des cellules, soulignant la possibilité d'une localisation cytoplasmique de cet ARN qui sera décrite par la suite. En réalisant une pile d'images espacées dans l'axe Z et en appliquant une reconstruction en 3 dimension de cellules sauvages, nous avons mis en évidence que l'ARN *TLC1* se regroupe dans 6 à 10 foci distincts dans le noyau des cellules, un nombre concomitant avec le nombre de regroupements télomériques décrit précédemment par immunofluorescence dirigée contre Rap1p (Levy & Blackburn, 2004; Schober et al, 2008).

L'absence de localisation diffuse de l'ARN *TLC1* suggère qu'il s'accumule dans des structures particulières, supposément les télomères.

## 1.2 L'ARN *TLC1* colocalise avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire.

Dans le but de déterminer si les foci d'ARN *TLC1* visualisés par *FISH* colocalisent avec les regroupements télomériques *in situ*, nous avons réalisé un *FISH* contre cet ARN couplé à une immunofluorescence contre la protéine Rap1p. Ce type d'immunofluorescence a déjà été utilisé pour détecter la position des télomères *in situ* (Palladino et al, 1993). Nous avons donc construit une souche sauvage qui porte une version étiquetée de la protéine Rap1p (*RAP1-13xMyc*) en position C-terminale. L'immunofluorescence anti-myc montre la position des regroupements télomériques *in situ*.

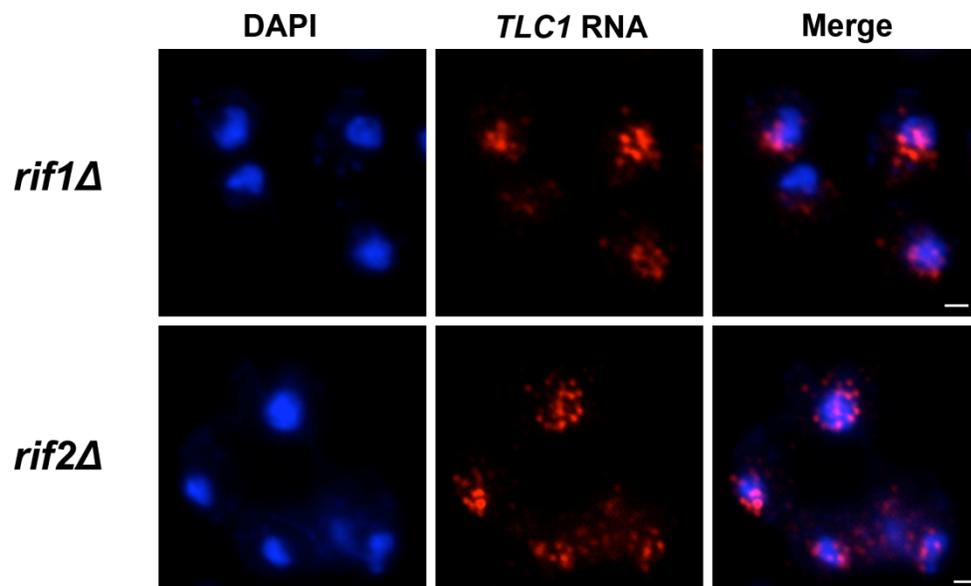


**Figure 34 : colocalisation entre l'ARN *TLC1* et les regroupements télomériques identifiés par immunofluorescence contre le marqueur télomériques Rap1p.**

Après déconvolution et projection maximale des signaux, la colocalisation a été mesurée avec le programme Metamorph. 92% du signal *TLC1* (rouge) colocalise avec le signal Rap1p (vert). DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm

Après reconstruction 3D et projection maximale, nous avons pu montrer que les foci d'ARN *TLC1* colocalisent avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire à plus de 90% (Fig. 34). Ce résultat confirme les résultats obtenus par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine qui montrent un enrichissement très important (x25) de la sous unité Est2p aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire (Taggart et al, 2002). Ce résultat est la première image montrant une colocalisation directe *in situ* entre la télomérase et son substrat, en condition endogène.

Dans le but de confirmer ce résultat, nous avons supposé que des mutations altérant le regroupement normal des télomères devraient affecter le nombre de foci d'ARN visualisés *in situ*. L'équipe du Dr Blackburn a montré, dans une étude précédente, que la présence des facteurs Rif1/2p aux télomères est nécessaire à leur regroupement normal (Levy & Blackburn, 2004). En effet, dans un contexte  $\Delta RIF1$  ou  $\Delta RIF2$ , un défaut de regroupement des télomères est observé. Nous avons vérifié la localisation de l'ARN *TLC1* par *FISH* dans des cellules  $\Delta RIF1$  et  $\Delta RIF2$  afin de compter le nombre maximal de foci de d'ARN observé (Fig. 35).



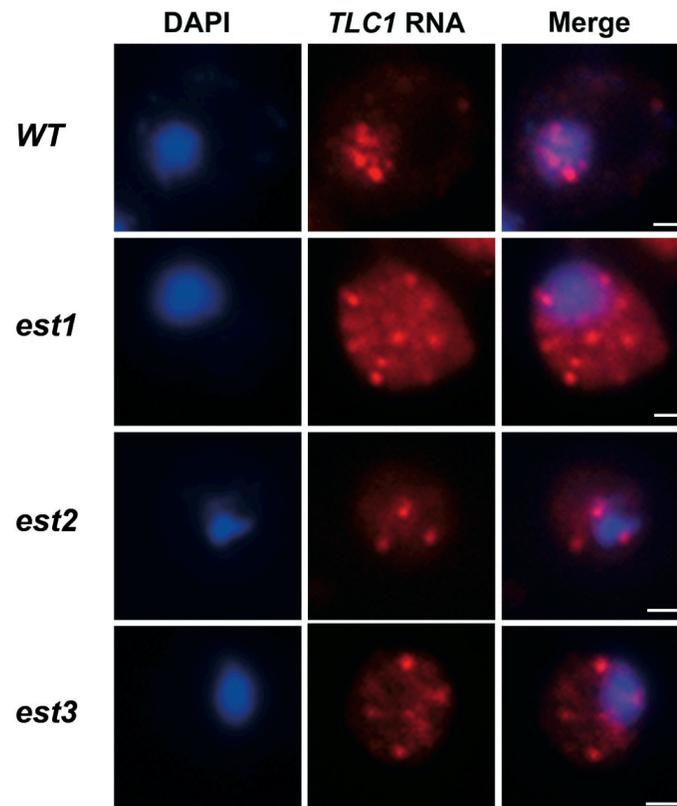
**Figure 35 : la délétion *RIF1* ou *RIF2* induit une augmentation du nombre de foci d'ARN *TLC1* détectés dans les noyaux des cellules.**

Des mutants  $\Delta RIF1$  ou  $\Delta RIF2$  ont été soumis au protocole de *FISH* et le nombre maximal de foci nucléaire d'ARN *TLC1* a été déterminé. Plus de vingt quatre foci individuels peuvent être visualisés dans certaines cellules sur un seul plan focal. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1 $\mu$ m.

Les résultats montrent une forte augmentation du nombre de foci d'ARN *TLC1* dans le noyau des cellules  $\Delta RIF1$  et  $\Delta RIF2$ , où plus de vingt quatre foci individuels d'ARN *TLC1* ont pu être visualisés. Ce résultat suggère que la télomérase reste associée stablement aux télomères même en cas d'altération de leur regroupement. Néanmoins, il aurait été intéressant d'effectuer cette expérience dans des cellules *RAP1-13xMyc* afin de vérifier l'association stable avec les télomères dans ces mutants. Nous avons ensuite déterminé la localisation de l'ARN *TLC1* lors de l'altération de la biogenèse du complexe télomérase, en délétant les *ESTs* et *yKU70/80*.

**1.3 La délétion des gènes codant pour les Estp ou yKu70/80p induit une accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1*.**

Nous avons vu précédemment que les Estp sont des composants essentiels à l'activité télomérase. Leur délétion va conduire au phénotype de sénescence réplivative lié à l'érosion progressive des télomères au fur et à mesure des générations. Afin de vérifier l'implication des protéines Estp dans la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1*, nous avons regardé sa localisation dans des souches délétées respectivement pour *EST1*, 2 et 3 (Fig. 36).

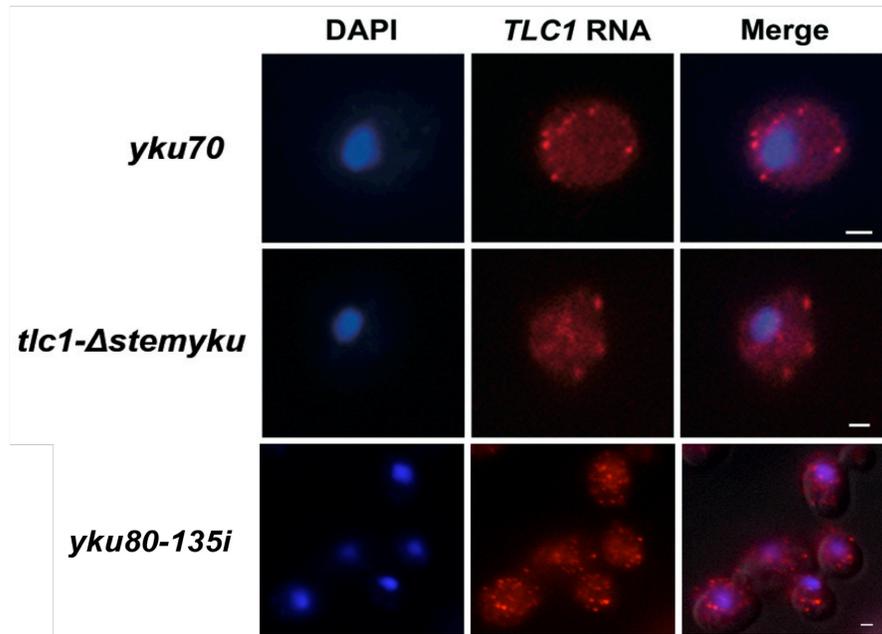


**Figure 36 : la délétion des gènes *EST* induit une accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1*.**

Des cellules  $\Delta EST1$ , 2 ou 3 ont été soumises au protocole de *FISH*. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1 $\mu$ m.

De façon surprenante, nous avons pu voir une très forte accumulation cytoplasmique d'ARN *TLC1* dans des souches délétées pour les *ESTs*, avec une forte pénétrance de ce phénotype au sein d'une population cellulaire (Fig. 40). Ce résultat montre que l'absence des protéines Est n'affecte pas seulement l'activité télomérase mais également la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1*, notamment son accumulation dans le noyau. Ces résultats suggèrent donc que les protéines Estp, en plus de leur activité catalytique, participent à la détermination de la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1*.

Nous savons également que la présence du complexe yKu70/80p est nécessaire au recrutement et à l'ancrage de la télomérase aux télomères (Fisher et al, 2004). Nous avons donc observé la localisation de l'ARN *TLC1* dans des mutants  $\Delta yKU70$  et *yku80-i135*, deux mutants défectifs du complexe yKu70/80p (Fig. 37).



**Figure 37 : le complexe yKu70/80p est essentiel à la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*.**

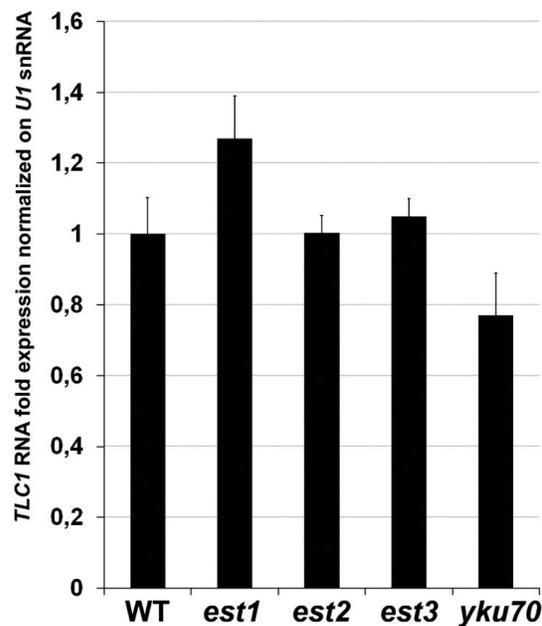
Des cellules *yKU70*, *yKu80-i135* ou *TLC1-ΔstemyKu* ont été soumises au protocole de *FISH*. Une accumulation cytoplasmique est visualisée dans ces cellules. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm.

De la même manière que la délétion des protéines Estp, la délétion d'un des facteurs du complexe yKu, ou la délétion du site de liaison de yKu sur l'ARN *TLC1*, induit une forte accumulation cytoplasmique de cet ARN (Fig. 40). Ce résultat, relié aux résultats précédents, suggère que la localisation nucléaire de la télomérase nécessite la présence de tous les facteurs protéiques de cette enzyme. Ces résultats supposent également que

l'assemblage de la télomérase est contrôlé et que l'absence d'un seul facteur entraîne une rétention cytoplasmique des enzymes mal assemblées.

#### 1.4 La délétion des gènes codant pour les protéines Estp ou yKu n'a pas d'influence sur l'expression et la maturation de l'ARN *TLC1*.

Il est possible que la délétion des protéines Est ou du complexe yKu influence l'expression ou la maturation de l'ARN *TLC1* et que la forme cytoplasmique que nous visualisons soit liée à un défaut de maturation ou d'expression de cet ARN. Nous avons donc mesuré les taux d'expression d'ARN *TLC1* dans les mutants  $\Delta EST1$ , 2, 3 et  $\Delta yKU70$  par RT-PCR quantitative (Fig. 38). Les niveaux d'expression de l'ARN *TLC1* ont été normalisés par rapport au taux d'expression de *U1*, un ARN de la classe des snARN qui ne varie pas lors de la délétion des Estp ou de yKu.

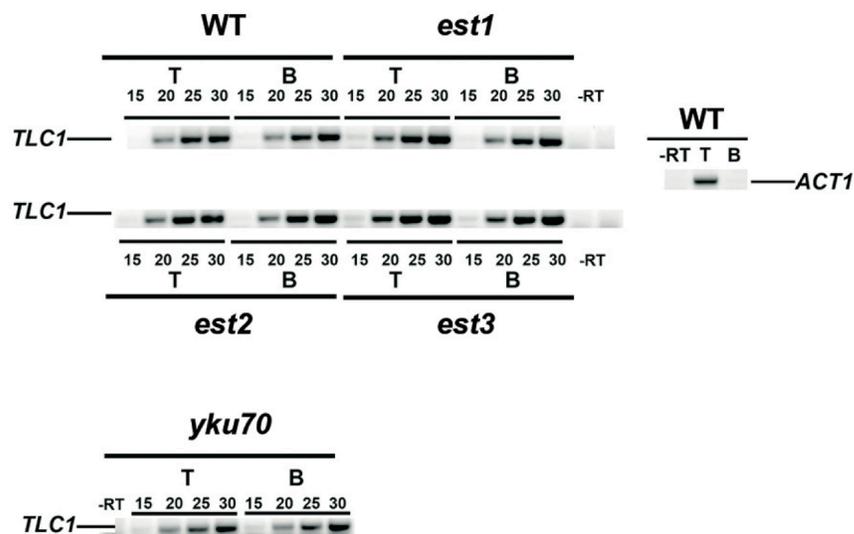


**Figure 38 : quantification de l'expression de l'ARN *TLC1* dans les différents mutants *EST* et *yKU70*.**

Les niveaux d'expression ont été mesurés par qRT-PCR et normalisés sur la concentration en snARN *UI*. L'ARN *TLC1* n'a pas de défaut d'expression dans ces mutants.

Les résultats ne montrent pas de défauts d'expression de l'ARN *TLC1* dans ces mutants, même si une légère baisse d'expression a été remarquée pour la délétion du gène *yKU70*, une baisse déjà remarquée dans une étude précédente (Mozdy et al, 2008). Il apparaît donc que le phénotype d'accumulation cytoplasmique n'est pas lié à un défaut d'expression de l'ARN *TLC1*.

Dans le but de vérifier que la délétion des *Estp* ou *yKu* n'a pas d'impact sur la maturation de l'ARN *TLC1*, nous avons vérifié les niveaux d'hyperméthylation de sa coiffe par immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffes tri-méthylées suivi de PCR semi-quantitative (Fig. 39).



**Figure 39 :** la maturation de la coiffe de l'ARN *TLC1* n'est pas altérée dans les mutants *EST* et *yKU*.

Les ARN totaux ont été extraits de cellules sauvages et mutantes puis une immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffes tri-méthylées a été réalisée. L'ARN

*ACT1* qui contient une coiffe mono-méthylée est utilisé comme contrôle négatif. T : ARN total ; B : fraction liée à la colonne. Les chiffres représentent les cycles de PCR effectués. – RT = PCR sans réaction de rétro-transcription, indique la présence éventuelle du gène *TLC1* dans l'expérience.

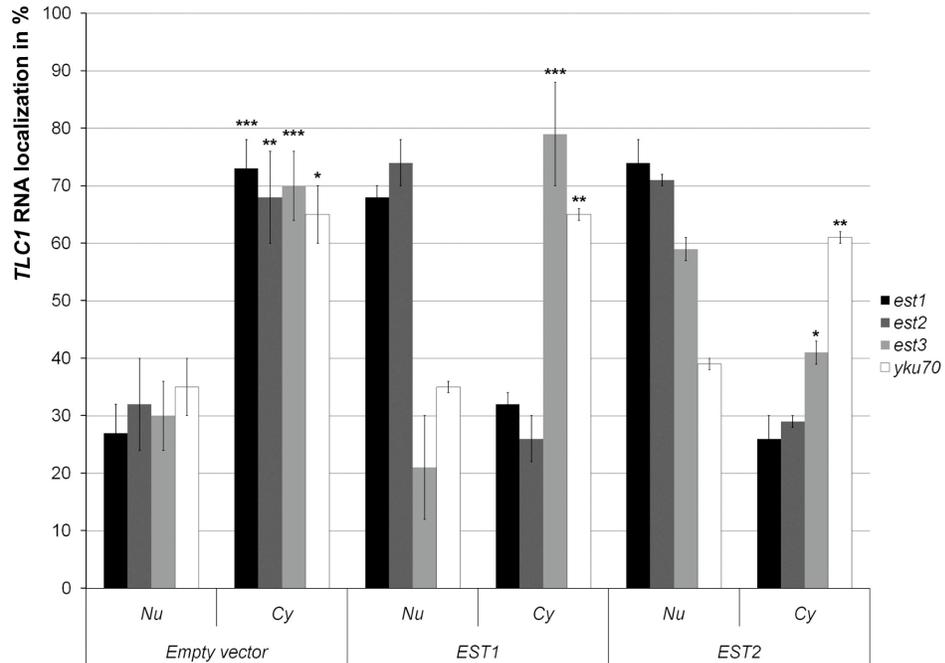
Nous avons utilisé comme contrôle négatif l'ARN de l'actine (*ACT1*) qui contient une coiffe mono-méthylée et comme contrôle positif encore une fois l'ARN *UI* (non-montré). Les résultats ne montrent pas de défauts d'hyperméthylation de la coiffe de l'ARN *TLC1* dans les différents mutants et les quantités immunoprécipitées dans ces mutants sont similaires. Ces résultats ont été confirmés par chromatographie d'affinité et PCR quantitative spécifique de la forme polyA+ de l'ARN *TLC1* (non-montré) et aucune accumulation de forme poly A+ n'a été détectée.

Ces deux résultats suggèrent que la délétion des *Estp* ou *yKu* n'a pas d'impact sur l'expression et la maturation de l'ARN *TLC1* et que ces mutations influencent donc directement sa localisation intracellulaire.

Nous savons, depuis les expériences de T. Hughes, que les protéines *Estp* sont capable de lier l'ARN *TLC1* de façon indépendante (Hughes et al, 2000). Un mutant  $\Delta EST2$  conserve la liaison de *Est1p* sur l'ARN *TLC1* et vice-versa. De ce fait, il est possible que la surexpression des protéines *Estp*, en l'absence de certains facteurs, complémente le phénotype d'accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1*. Nous avons donc réalisé des expériences de surexpression des *Estp* pour voir si cette surexpression restaure la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*.

## **1.5 Le complexe *yKu70/80p* est critique pour la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*.**

Afin de déterminer si les protéines Estp et yKu participent à la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1* de la même manière, nous avons surexprimé *EST1* ou *EST2* dans des contextes délétés pour les gènes *EST1*, *2*, *3* et *yKU70* (Fig. 40).



**Figure 40 : la surexpression de *EST1* et *2* complémente leur délétion mais ne complémente pas une délétion du gène *yKU70* pour l'accumulation nucléaire de l'ARN *TLC1*.**

Les cellules délétées ont été transformées avec les plasmides pVL399 (vide), pVL784 (*EST1*) ou pVL999 (*EST2*) et soumises au protocole de *FISH*. 100 cellules ont été comptées pour la localisation de l'ARN *TLC1* dans trois expériences indépendantes. Nu : noyau, Cy : cytoplasme. Les mutants sont indiqués à droite, les vecteurs transformés en bas.

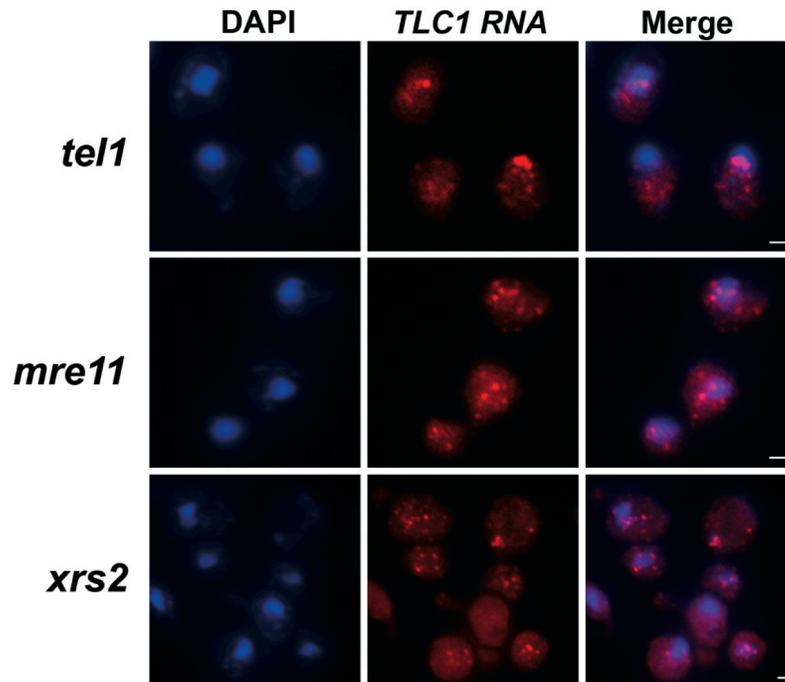
La transformation des cellules mutantes avec un vecteur vide n'a aucun impact sur la localisation de l'ARN *TLC1*. Comme attendu, la surexpression *EST1* et *EST2* dans une souche délétées de *EST1* et *EST2* respectivement, restaure la localisation nucléaire de cet ARN.

Cependant, la surexpression de *EST1* dans des souches délétées pour *EST2* ou réciproquement restaure la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1* à des niveaux comparables aux cellules sauvages. La surexpression de ces deux protéines dans des cellules délétées pour *EST3* entraîne un phénotype de restauration partiel. La surexpression de *EST1* ou *EST2* dans un mutant  $\Delta yKU70$  est incapable de restaurer le phénotype d'accumulation nucléaire. Ce résultat suggère que *EST1* et *EST2* peuvent trans-complémenter leur délétion, mais ces deux protéines ne peuvent pas contourner l'absence de yKu70p. Il apparaît donc que la présence du complexe yKu70/80p est absolument requise pour l'accumulation nucléaire de l'ARN *TLC1*. Un fait intéressant reste que même si les mutants Estp sénescence après 60 à 100 génération, le mutant *yKU70* ne montre pas de phénotype de sénescence, même si ses télomères sont très courts (Gravel et al, 1998).

Nous savons également, depuis l'étude de T.Fisher, que le complexe yKu70/80p est nécessaire à l'association stable de la télomérase aux télomères mais d'autres facteurs sont également importants (Fisher et al, 2004). Comme décrit dans l'introduction, le complexe MRX et la kinase Tel1p participent également au recrutement de la télomérase aux télomères.

## **1.6 Un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères prévient l'accumulation nucléaire de l'ARN *TLC1*.**

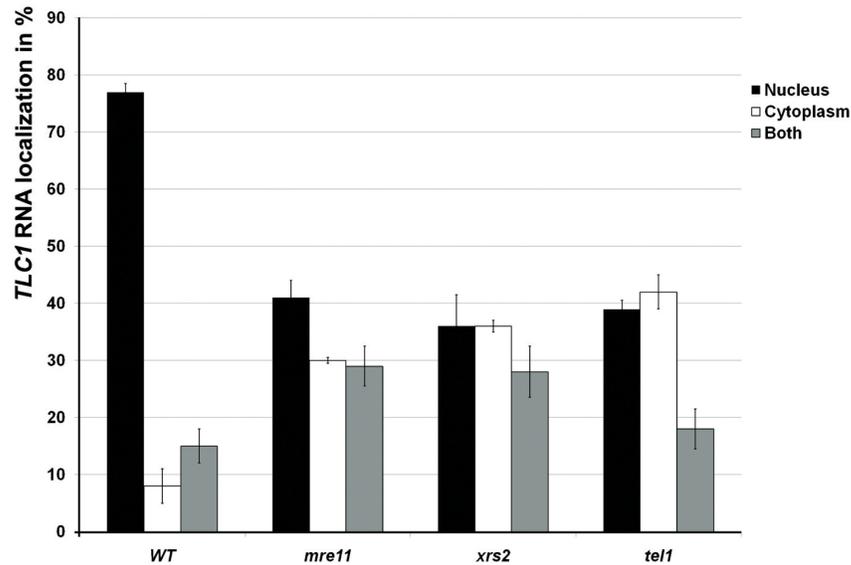
Dans le but de vérifier si un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères entraîne une modification de la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1*, nous avons observé la localisation de cet ARN dans des mutants du complexe MRX et Tel1p (Fig. 41).



**Figure 41 : l'altération du recrutement de la télomérase aux télomères modifie la localisation intracellulaire de l'ARN *TLC1*.**

Des cellules délétées pour des facteurs du complexe MRX ( $\Delta mre11$ ,  $\Delta xrs2$ ) ou pour la kinase Tel1p ont été soumises au protocole de *FISH*. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1  $\mu$ m.

Effectivement, nous avons pu remarquer que la délétion de composants du complexe MRX ou de Tel1p induit une relocalisation partielle de la télomérase vers le cytoplasme. Pour avoir une idée de la pénétrance de ce phénotype dans une population cellulaire, nous avons caractérisé la localisation de l'ARN *TLC1* dans 100 cellules (Fig. 42).



**Figure 42 : Pénétrance du phénotype d'accumulation cytoplasmique dans les mutants déficients pour le recrutement de la télomérase aux télomères.**

100 cellules ont été comptées pour chaque délétion.

Ce comptage montre que l'ARN *TLC1* est effectivement relocalisé vers le cytoplasme dans des mutants de recrutement de la télomérase aux télomères, même si le phénotype n'est pas aussi drastique que dans les mutants Estp. Nos résultats suggèrent donc que l'assemblage et l'ancrage de la télomérase aux télomères est important pour la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*.

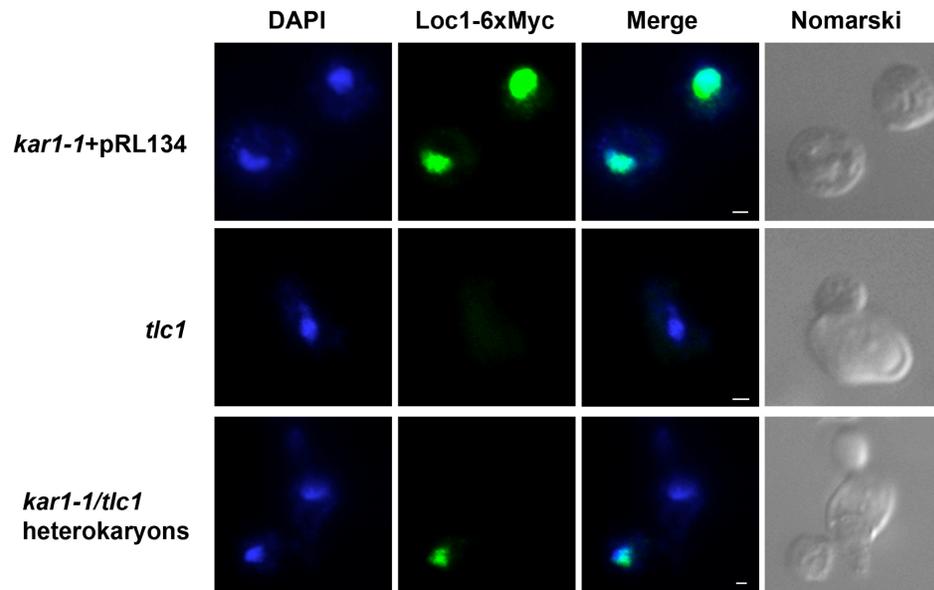
Ce phénotype d'accumulation cytoplasmique peut cependant être lié à plusieurs mécanismes. Comme la mutation du complexe yKu ou de MRX induit un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères, les complexes pourraient être exportés dans le cytoplasme à cause d'un défaut d'ancrage. Il est également possible que l'ARN *TLC1* fasse la navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules et que ce trafic nucléocytoplasmique soit requis pour sa biogénèse.

## **1.7 L'ARN *TLC1* fait la navette entre le noyau et le cytoplasme en condition endogène.**

Afin de déterminer les capacités de trafic nucléo-cytoplasmique de la forme endogène de l'ARN *TLC1*, nous avons repris les expériences de formation d'hétérokarya du Dr Lingner en l'appliquant sur la forme endogène de cet ARN (Teixeira et al, 2002).

Nous avons réalisé un croisement entre une souche  $\Delta TLC1$  et une souche sauvage portant une version modifiée de l'allèle *KARI* qui autorise la fusion cellulaire mais prévient la caryogamie. Les hétérokarya ont été identifiés par critères morphologiques (cellules énormes, en forme d'haltère avec bourgeon et multi-nucléées). Comme la mitose est fermée chez la levure (pas de disruption de l'enveloppe nucléaire), la présence de l'ARN *TLC1* dans les différents noyaux de l'hétérokaryon ne peut être liée qu'à sa capacité de trafic nucléo-cytoplasmique.

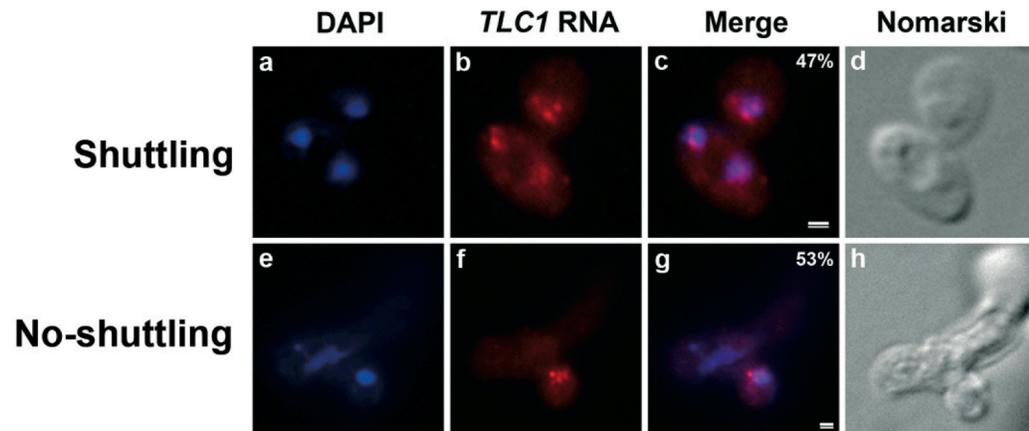
Cependant, ce type d'expérience est en général critiqué à cause d'un problème de rétention nucléaire qui induit une fuite de matériel dans le cytoplasme dans certaines conditions expérimentales (Olson & Siliciano, 2003). Pour cela, nous avons vérifié tout d'abord que notre expérience ne possédait pas de biais lié à un défaut de rétention nucléaire. Nous avons utilisé une propriété de la protéine Loc1p à être localisée uniquement au noyau. Cette protéine est strictement nucléaire et ne fait pas la navette entre le noyau et le cytoplasme (Long et al, 2001). En utilisant une construction inductible d'une version étiquetée de Loc1p (pGal-*LOC1-9xMyc*), nous avons déterminé s'il existait effectivement ou non une fuite nucléaire lors de la formation d'hétérokarya (Fig. 43).



**Figure 43 : les hétérokarya ne présentent pas de fuite nucléaire dans nos conditions expérimentales.**

Une souche *kar1-1* a été croisée avec une souche  $\Delta TLC1$  pendant 5h et les hétérokarya ont été visualisés afin de détecter la présence de la protéine Loc1p (pRL134) par immunofluorescence dans les différents noyaux. 100% des hétérokarya montraient une absence d'accumulation cytoplasmique de la protéine Loc1p. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1  $\mu$ m.

Comme attendu après croisement, la protéine Loc1p ne peut être détectée que dans un seul des noyaux de l'hétérokaryon. Ce résultat démontre l'absence de fuite nucléaire dans notre système. Nous avons donc utilisé la même expérience en réalisant un *FISH* contre l'ARN *TLC1* (Fig. 44).



**Figure 44 : L'ARN *TLC1* fait la navette entre le noyau et le cytoplasme en condition endogène.**

La même méthode que dans la figure précédente a été réalisée en croisant des cellules *kar1-1* à des cellules  $\Delta$ *TLC1*. 50% des hétérokarya observés possédaient l'ARN *TLC1* dans tous les noyaux. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1  $\mu$ m.

Nous avons pu observer deux cas de figure. Dans environ 50% des cas, l'ARN *TLC1* a été détecté dans la totalité des noyaux des hétérokarya, indiquant la présence d'un trafic nucléo-cytoplasmique où l'ARN *TLC1* synthétisé dans le noyau donneur va être exporté et réimporté dans les noyaux receveurs  $\Delta$ *TLC1*. Cependant, dans 50% des cas, aucun trafic nucléo-cytoplasmique n'a été détecté. Une des limites du système repose sur le fait que nous ne pouvons pas contrôler précisément le temps nécessaire à la formation d'hétérokarya. Il est possible que les hétérokarya ne présentant pas de trafic soient des hétérokarya nouvellement formés. Dans le même ordre d'idée, les hétérokarya présentant un trafic seraient des hétérokarya s'étant formés précocement lors de l'expérience.

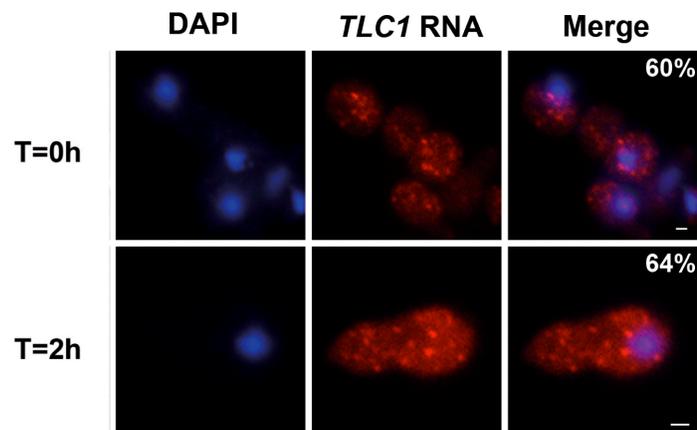
Néanmoins, notre expérience montre clairement pour la première fois la présence d'un trafic nucléo cytoplasmique pour la forme endogène de l'ARN de la télomérase chez

*S.cerevisiae*, comme il avait été suggéré par les laboratoires des Dr Lingner et Fletcher. Cependant, les moteurs de transport impliqués dans ce processus sont inconnus.

### 1.8 L'ARN *TLC1* mature est exporté par une nouvelle voie Crm1p dépendante.

Nous avons donc testé des mutants des voies d'export dépendantes de Mex67p et Crm1p afin de vérifier leur implication dans le trafic intracellulaire de l'ARN *TLC1* (Fig. 45/46). Nous nous sommes placé dans un fond génétique où le gène *yKU70* est délété afin d'accumuler des molécules d'ARN *TLC1* dans le cytoplasme des cellules.

#### *mex67-5 yku70*

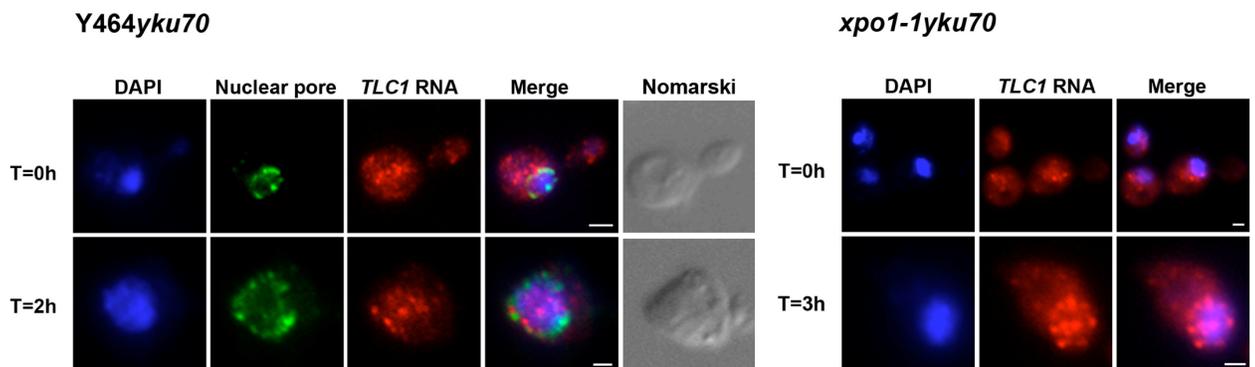


**Figure 45 :L'ARN *TLC1* n'est pas exporté par une voie Mex67p dépendante.**

Des cellules thermosensibles *mex67-5 yku70* ont été soumises au protocole de *FISH* à t=0 ou 2h à température restrictive (37°C). DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm

Comme visualisé sur cette figure, l'inhibition de l'export des ARNm par la forme thermosensible de la protéine Mex67p n'induit pas de blocage d'export de l'ARN *TLC1*. Nous avons donc montré que cet ARN est exporté indépendamment de la voie Mex67p.

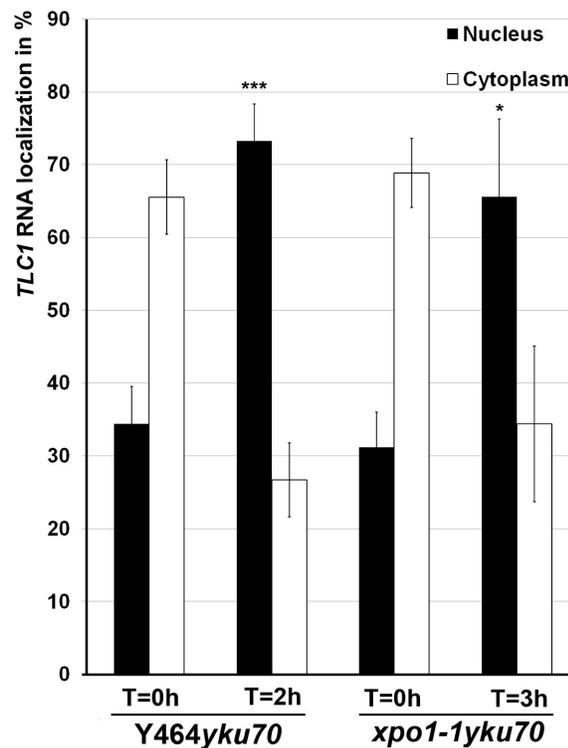
Nous avons poursuivi en utilisant deux versions de la protéine Crm1p, une humanisée et une thermosensible. Un inhibiteur connu de la protéine Crm1p est la leptomycine B qui est capable de lier Crm1p et va inhiber sa liaison sur les cargos à exporter. Cependant, la protéine Crm1p de levure est insensible à la leptomycine B. Nous avons donc utilisé une souche contenant une mutation ponctuelle de Crm1p (T539C) qui restaure la liaison à la leptomycine B (Neville & Rosbash, 1999). Cette souche a été couramment utilisée principalement pour l'étude de l'export des particules pré-ribosomiques. Pour les mêmes raisons que précédemment mentionnées, les cellules sont déléetées du gène *yKU70*.



**Figure 46 : l'ARN *TLC1* est exporté par une voie Crm1p dépendante.**

Des cellules Crm1-T539C (*Y464*)  $\Delta yKU70$  et Crm1 thermosensible (*xpo1-1*)  $\Delta yKU70$  ont été soumises au protocole de *FISH* à t=0 et 2h après traitement à la leptomycine B ou 3h à température restrictive. La position des pores nucléaire a été visualisée par immunofluorescence dirigée contre les motifs FG des nucléoporines. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1 $\mu$ m

Nous avons également réalisé une immunofluorescence dirigée contre les motifs FG des nucléoporines afin de déterminer la position absolue de l'enveloppe nucléaire. Comme indiqué sur la figure 46, l'absence de leptomycine B et la croissance à température permissive montrent une accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1*, lié au phénotype  $\Delta yKU70$ . Cependant, après 2h de traitement à la leptomycine B et 3h à température restrictive, nous avons pu observer une accumulation très nette de l'ARN *TLC1* dans le noyau des cellules (Fig. 46). Cette accumulation a été quantifiée sur une population cellulaire (Fig. 47).



**Figure 47 : quantification de la pénétrance du phénotype de restauration nucléaire observé pour l'ARN *TLC1* dans les souches *crm1*.**

La pénétrance du phénotype a été mesurée sur 100 cellules dans trois expériences indépendantes.

Ce résultat suggère donc que l'ARN *TLC1* est exporté par une voie Crm1p-dépendante. Nous avons également vérifié que c'est bien une forme d'ARN *TLC1* mature qui est exportée car aucun défaut de maturation de la coiffe n'a été détecté après traitement à la leptomycine B (Fig. 48).



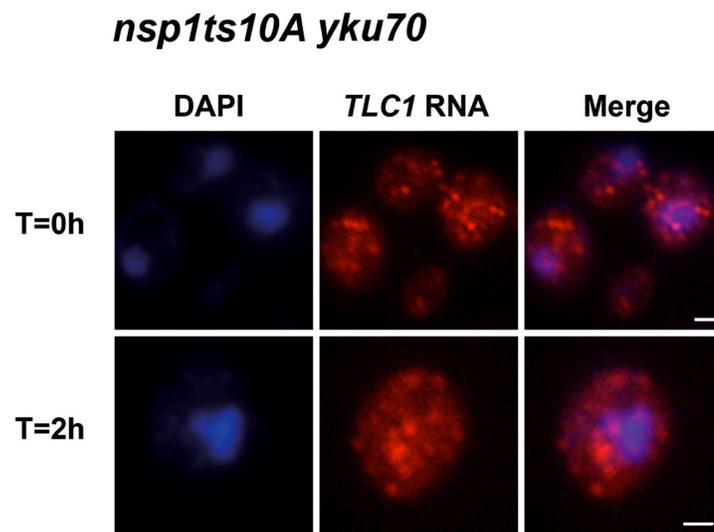
**Figure 48 : le blocage de l'export nucléaire de l'ARN *TLC1* n'entraîne pas de défauts de maturation de cet ARN.**

Les ARN totaux ont été extraits de cellules *Y464* avant et après traitement à la leptomycine B et une immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffe tri-méthylées a été réalisée. T : ARN total ; B : fraction liée à la colonne. Les chiffres représentent les cycles de PCR effectués. -RT = PCR sans réaction de rétro-transcription, indique la présence éventuelle du gène *TLC1* dans l'expérience.

Ce résultat suggère donc que c'est la forme mature de l'ARN *TLC1* qui est exportée dans le cytoplasme et que la maturation de sa coiffe se produit avant son export nucléaire.

On sait que Crm1p est impliqué dans l'export d'une variété de cargos à l'intérieur des cellules et que l'inhibition de Crm1p par la leptomycine B va avoir un effet pleïotropique. Afin de vérifier si l'export nucléaire de l'ARN *TLC1* se fait en coopération avec l'export des particules ribosomiques ou indépendamment, nous avons vérifié la localisation de l'ARN *TLC1* dans un mutant *nsp1* (Fig. 49). Nsp1p est un composant essentiel du pore nucléaire impliqué spécifiquement dans l'export des sous-unités ribosomiques (Gleizes et al, 2001). Nous avons donc utilisé une souche thermosensible

pour Nsp1p et délétée du gène *yKU70* afin de regarder à température permissive ou restrictive la localisation de l'ARN *TLC1*.



**Figure 49 : l'ARN *TLC1* est exporté indépendamment de l'export des particules pré-ribosomiques.**

La souche *nsp1ts10A yku70* a été soumise au protocole de FISH à t=0 ou après 2h à température restrictive (37°C). DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm.

Comme démontré sur cette figure, la localisation de l'ARN *TLC1* est toujours cytoplasmique après 2h à température restrictive, indiquant que cet ARN est exporté de façon indépendante des particules pré-ribosomiques.

En conclusion, nous avons démontré que l'ARN *TLC1* est exporté par une nouvelle voie Crm1p-dépendante et de manière indépendante de la voie d'export des ARNr. De plus, nous avons montré que c'est la forme mature de cet ARN qui est exportée dans le cytoplasme.

## 1.9 L'ARN *TLC1* est importé dans le noyau par une voie Kap122p/Mtr10p dépendante.

Puisque l'ARN *TLC1* est exporté par un mécanisme actif, nous avons supposé qu'il était également importé par un mécanisme actif. L'import de complexes protéiques est dépendant de la présence d'importines qui font le lien entre cargos et le moteur de transport Ran. Il existe douze importines différentes chez la levure *S.cerevisiae* (source : *Saccharomyces Genome Database*). Nous avons reçu, du laboratoire du Dr Jackie Vogel, la collection des mutants nuls ou conditionnels de toutes les importines de *S.cerevisiae* (sauf Kap95p et Kap104p qui n'ont pas été testées). Nous avons donc poursuivi notre étude en regardant quelles importines étaient responsables de l'import de l'ARN *TLC1* (Fig. 50).

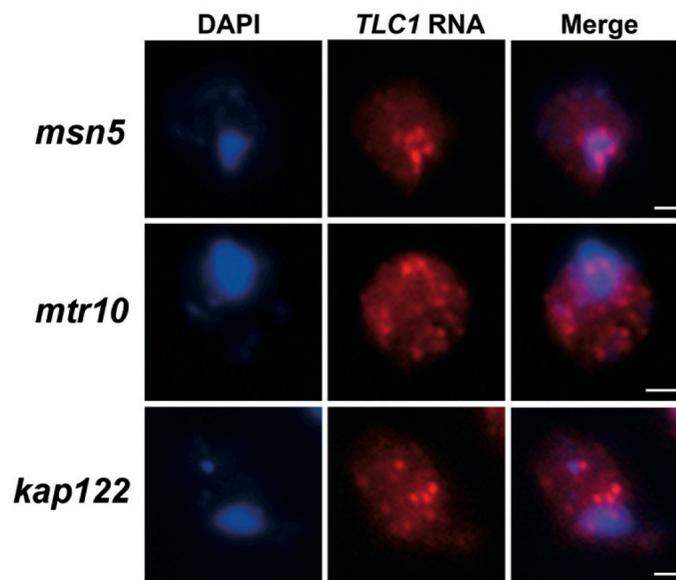
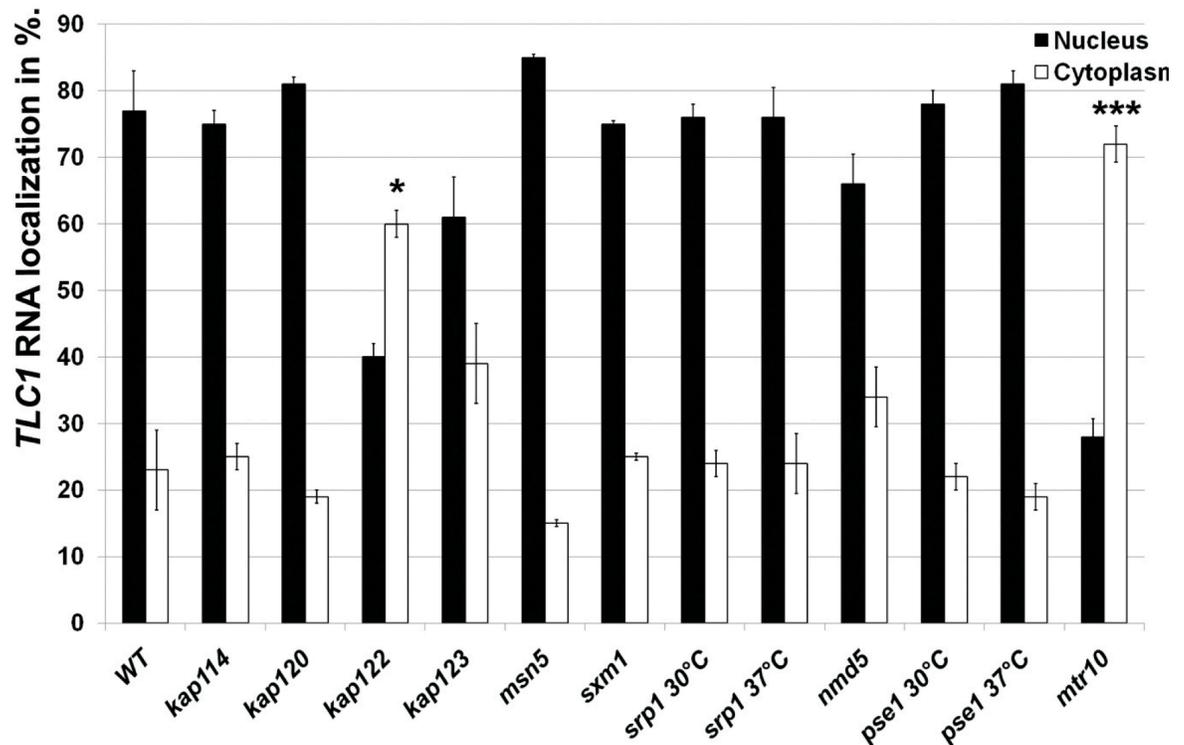


Figure 50 : la délétion des importines Mtr10p et Kap122p induit un défaut d'import de l'ARN *TLC1*.

La souche *msn5* est présenté comme n'ayant pas de défaut d'import nucléaire. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm

Comme attendu, la délétion de la plupart des importines n'a pas d'effet sur la localisation de l'ARN *TLC1* (ex : *msn5*) (Fig. 51). Cependant, nous avons pu détecter une accumulation cytoplasmique de cet ARN dans des cellules délétées pour *MTR10* (comme précédemment suggéré) et *KAP122*.



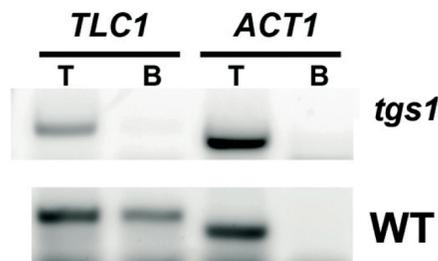
**Figure 51 : quantification de la pénétrance du phénotype d'accumulation cytoplasmique observé pour l'ARN *TLC1* dans les souches délétées pour les différentes importines.**

La pénétrance du phénotype a été mesurée sur 100 cellules.

Ce résultat montre donc que l'ARN *TLC1* est importé par une voie dépendante des importines Mtr10p et Kap122p. Cependant, les facteurs impliqués dans la maturation de la coiffe de l'ARN *TLC1* sont inconnus.

### 1.10 La protéine Tgs1p hyperméthyle la coiffe de l'ARN *TLC1* dans le nucléole.

Le trafic nucléo-cytoplasmique de la forme mature de l'ARN *TLC1* suggère que cet ARN va être maturé dans le noyau avant son export nucléaire. Certaines équipes ont proposé que la protéine Tgs1p, une protéine nucléolaire impliquée dans l'hyperméthylation de la coiffe des snARN et snoARN, serait impliquée dans la maturation de la coiffe de l'ARN *TLC1* (Mouaikel et al, 2002; Verheggen et al, 2002). Cependant, aucune preuve directe de ce mécanisme n'a été fournie. Nous avons donc vérifié cette implication en utilisant une technique d'immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffes tri-méthylées dans des souches WT et  $\Delta TGS1$  (Fig. 52).



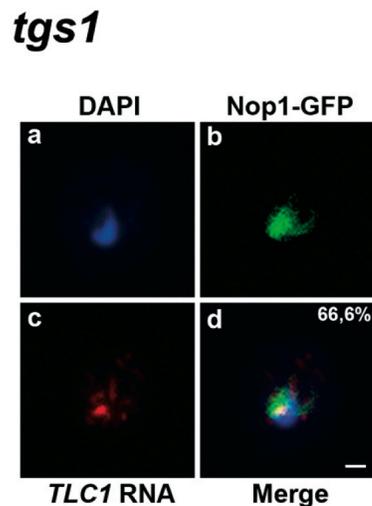
**Figure 52 : la maturation de la coiffe de l'ARN *TLC1* est altérée dans un mutant  $\Delta TGS1$ .**

Les ARN totaux ont été extraits de cellules sauvages et mutantes et une immunoprécipitation d'ARN contenant des coiffes tri-méthylées a été réalisée. L'ARN

*ACT1* qui contient une coiffe mono-méthylée est utilisé comme contrôle négatif. T : ARN totaux ; B : fraction liée à la colonne. 30 cycles de PCR ont été effectués.

Les résultats montrent un défaut d'hyperméthylation de la coiffe de l'ARN *TLC1* dans des souches délétées pour *TGS1*. Ce résultat confirme donc l'importance de la protéine Tgs1p pour le processus de maturation de l'ARN *TLC1*. Ces résultats ont été confirmés plus tard par les travaux du Dr Ehrenhofer-Murray (Franke et al, 2008).

Une question restait en suspens, où se trouve l'ARN *TLC1* dans des cellules délétées pour *TGS1* ? Nous avons répondu à cette question en réalisant un *FISH* contre cet ARN dans cette souche (Fig. 53).



**Figure 53 : l'ARN *TLC1* s'accumule dans le nucléole des cellules  $\Delta TGS1$ .**

Les cellules  $\Delta TGS1$  exprimant un marqueur nucléolaire Nop1-GFP ont été soumises au protocole de *FISH*. 67% des cellules montrent une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1*. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1 $\mu$ m.

Le résultat démontre que l'ARN *TLC1* s'accumule dans le nucléole des cellules  $\Delta TGS1$ , visualisé par une construction Nop1-GFP, un marqueur nucléolaire couramment

utilisé en microscopie. Il implique également pour la première fois le compartiment nucléolaire dans la biogénèse et le trafic de l'ARN de la télomérase chez *S.cerevisiae*.

Nous avons donc pu proposer un modèle de la biogénèse et de la maturation de l'ARN de la télomérase, en condition endogène, chez la levure *S.cerevisiae* qui sera décrit dans la section Discussion (Fig. 71).

Dans ce chapitre, nous avons donc disséqué les étapes de la biogénèse et de la maturation de l'ARN *TLC1 in situ*. Nous montrons qu'un mécanisme de trafic nucléocytoplasmique de cet ARN relie assemblage de la télomérase à l'homéostasie des télomères.

Nos résultats ont montré pour la première fois la localisation endogène de l'ARN *TLC1*, sa colocalisation avec les télomères et son échange actif entre noyau, cytoplasme et nucléole.

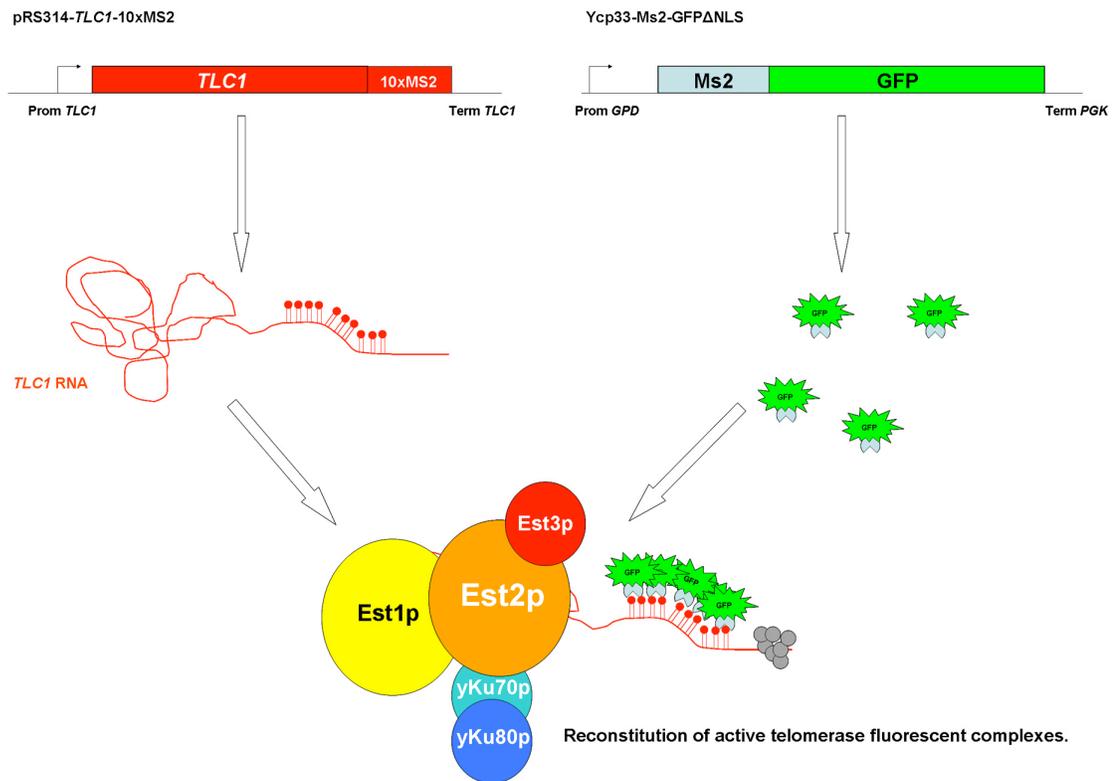
Néanmoins, même si la localisation d'ARN par *FISH* est très puissante pour décrire des étapes de maturation ou d'assemblage à un instant donné. La faiblesse de cette technique repose sur sa statique. En effet, elle ne donne aucune information dynamique sur la localisation de cet ARN *in vivo*. Comme nous le verrons par la suite, le comportement *in vivo* d'un complexe ribonucléoprotéique peut être fondamentalement différent de son comportement *in situ*.

## **Chapitre 2 : détection de la localisation endogène de l'ARN *TLC1* *in vivo* par utilisation du système MS2.**

Les résultats de ce chapitre seront soumis au journal *Science* à l'hiver 2010. Madame Nancy Laterreur est co-auteur de cet article et a réalisé les expériences des figures 55 à 58.

### **2.2 La construction *TLC1-10xMS2* complémente parfaitement une délétion du gène *TLC1*.**

Afin de détecter la localisation *in vivo* de l'ARN *TLC1*, nous avons introduit 10 tiges boucles MS2 en 5' du site de liaison aux protéines Sm de cet ARN. Nous avons construit un vecteur exprimant une version de la protéine MS2 fusionnée à la GFP. La protéine MS2-GFP est dépourvue de NLS mais, de par sa petite taille, diffuse librement dans le noyau et le cytoplasme. Comme la protéine MS2 lie sa séquence cible en tant que dimère, vingt molécules de GFP devraient idéalement être présentes sur les complexes télomériques contenant l'ARN *TLC1-10xMS2*. La concentration locale en GFP devrait être suffisante pour déterminer la position de l'ARN *TLC1* *in vivo* (Fig. 54).

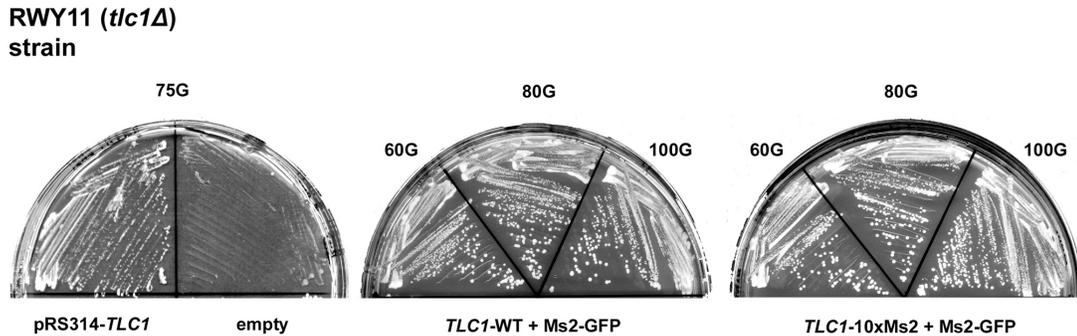


**Figure 54 : illustration du système à deux composante utilisé pour suivre la localisation de l'ARN *TLC1* *in vivo*.**

Le vecteur pRS314 entraîne l'expression de la version *TLC1-10xMS2* de façon contrôlée par le promoteur et terminateur endogène de *TLC1*. Le vecteur *Ycp33-MS2-GFPΔNLS* exprime la protéine MS2-GFP qui diffuse dans les cellules. L'association entre ces deux constructions restaure une télomérase active fluorescente.

Ces deux constructions sont transformées dans une souche  $\Delta TLC1$  afin de vérifier le comportement de l'ARN *TLC1-10xMS2* comparé à la forme sauvage (*TLC1* WT). Avant d'utiliser de telles constructions en imagerie, il est nécessaire de montrer que cette construction complète parfaitement la délétion de *TLC1*.

Nous avons donc vérifié que la présence de l'ARN *TLC1-10xMS2* annulait le phénotype de sénescence observé dans des souches délétées pour *TLC1* (Fig. 55).

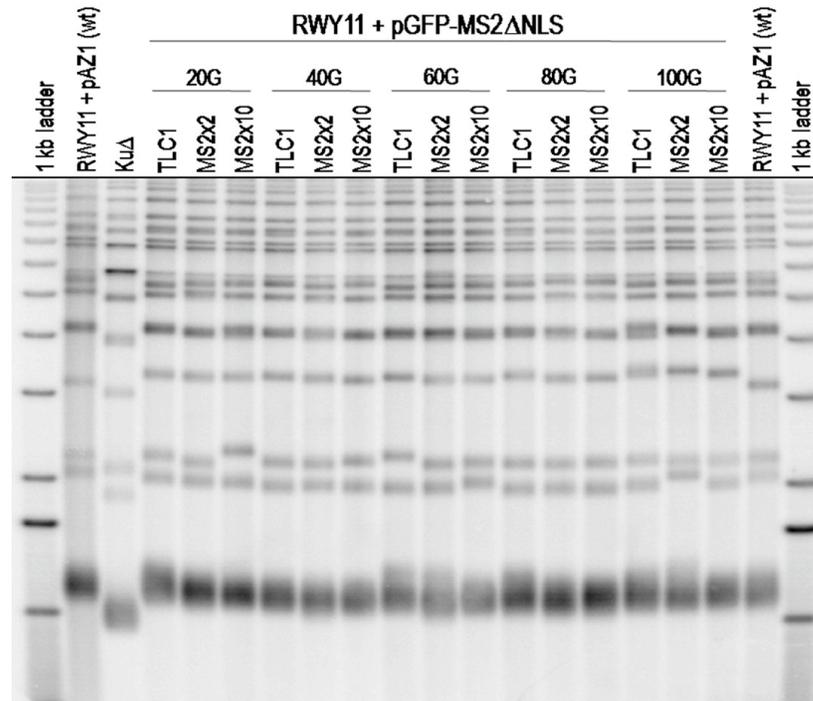


**Figure 55 : la construction *TLC1*-GFP restaure le phénotype de sénescence observé dans des cellules  $\Delta$ *TLC1*.**

La souche RWY11 a été transformée avec le plasmide Ycp33-MS2 GFP $\Delta$ NLS et pRS314-*TLC1-10xMS2* ou pRS314 *TLC1*WT. Les deux constructions restaurent la croissance normale d'une souche  $\Delta$ *TLC1* après 100 générations.

Comme visualisé sur la figure 55, les souches  $\Delta$ *TLC1* sénescent après 75 générations de croissance à cause du problème de fin de réplication. La complémentation par *TLC1-10xMS2* restaure la croissance des souches même après 100 générations. Le même phénotype est observé pour une version sauvage de l'ARN *TLC1*.

En regardant la longueur des télomères dans ces souches, nous avons montré que les souches complémentées présentent des télomères de longueur identiques à ceux des cellules sauvages (Fig. 56).

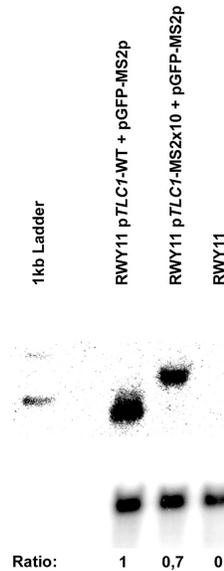


**Figure 56 : mesure de la longueur des télomères dans les souches  $\Delta TLC1$  complémentées par la version  $TLC1-10xMS2$ .**

L'ADNg des différentes souches a été extrait et digéré par Xho1 afin de libérer la portion terminale du télomère. Après migration et transfert, la longueur des télomères a été mesurée par Southern-blot avec une sonde s'hybridant aux séquences télomériques (sonde pCT300 radiomarquée au  $P^{32}$ ). Une souche exprimant une version sauvage de  $TLC1$  (RWY11+pAZ1) est présentée. La souche  $\Delta KU70$  est utilisée pour visualiser les télomères courts. Les différentes constructions  $TLC1-MS2$ , à différentes générations, sont présentées.

Ce résultat suggère donc que l'ARN  $TLC1-10xMS2$  est incorporé dans des particules télomériques actives qui restaurent la croissance et la longueur des télomères de souches délétées pour  $TLC1$ . Cependant, il est possible que la présence de l'étiquette MS2 influe sur la transcription ou la stabilité de cet ARN, mais également sur l'activité catalytique de la télomérase. Dans le but de répondre à ces questions, nous avons effectué des expériences de Northern-blot et d'essai d'extension d'amorces télomériques *in vitro*.

Nous avons extrait l'ARN total des souches *TLC1* WT et *TLC1-10xMS2* et vérifié la concentration de l'ARN *TLC1* en normalisant par rapport à un ARN contrôle (l'actine, *ACT1*) (Fig. 57). Les résultats montrent que l'ARN *TLC1-10xMS2* est exprimé de façon quasi sauvage dans ces cellules (ratio 0,7 vs WT).

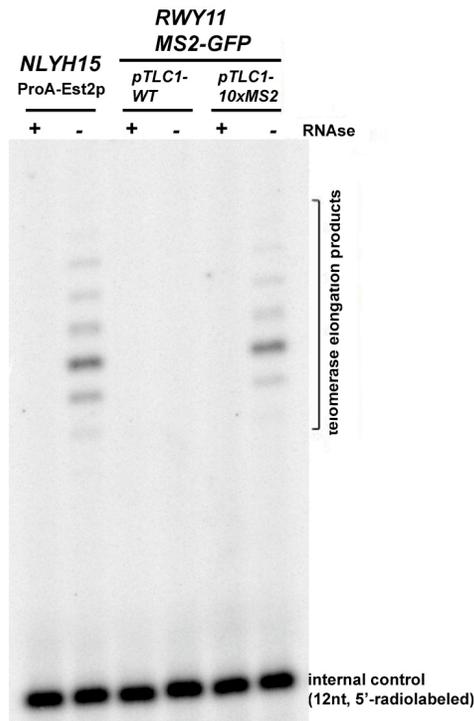


**Figure 57 : la construction *TLC1-10xMS2* est exprimée à des niveaux quasi sauvage par rapport à une construction WT.**

Les ARN totaux ont été extraits et résolus sur gel d'agarose/formamide. La membrane a été hybridée avec une sonde dirigée contre l'ARN *TLC1* radiomarquée. Le résultat a été quantifié à l'aide d'un phospho-imager et normalisé par rapport à la concentration de l'ARN de l'Actine.

Afin de vérifier l'activité catalytique des télomérases fluorescentes produites par ces constructions, nous avons réalisé un essai d'extension d'amorces télomériques *in vitro* (Fig. 58). Les complexes télomérase sont extraits des cellules par immunoprécipitation de la protéine GFP. Nous avons utilisé comme contrôle positif une souche contenant une version étiquetée de la protéine Est2p. Les complexes purifiés sont ensuite mis en présence de

matrice et de nucléotides radiomarqués. Les produits d'extension sont résolus sur gel d'électrophorèse.



**Figure 58 : la construction *pTLC1-10xMS2* présente une activité télomérase sauvage.**

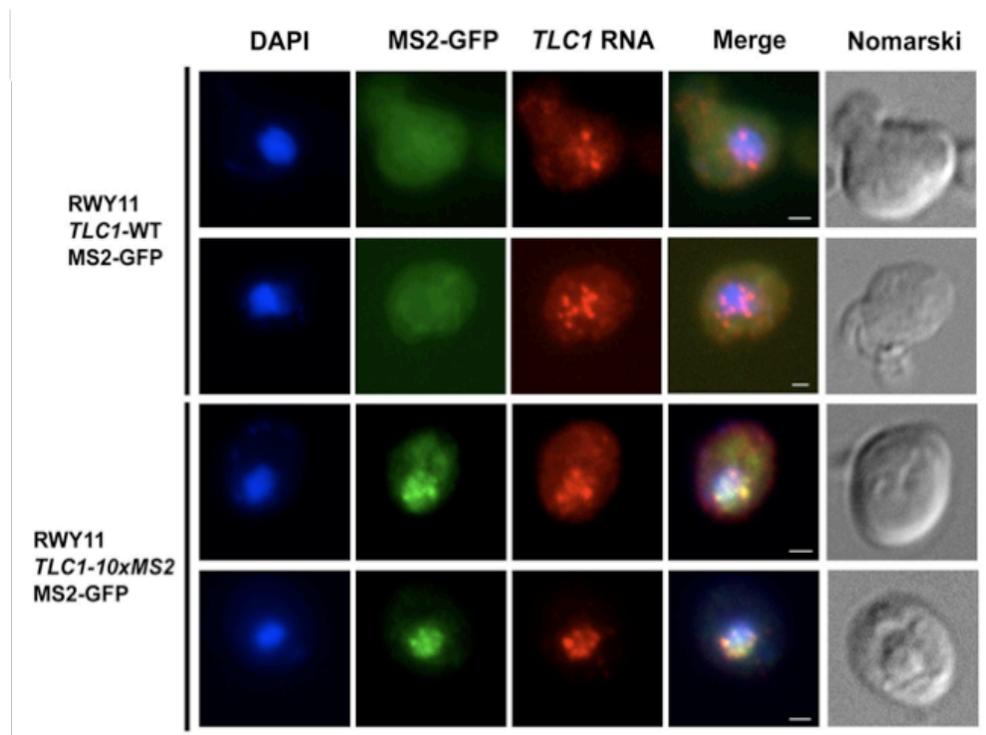
Les différentes cellules transformées avec les constructions indiquées ont été lysées et une immunoprécipitation de Est2p (à gauche, contrôle positif) ou MS2-GFP (à droite) ont été réalisées en condition native. Les immunoprécipitats ont été mis en présence de d'amorces correspondantes à la séquence télomérique et en présence de nucléotides radiomarqués. Les produits d'extension ont été résolus sur gel d'acrylamide. La présence d'ARNase ajoutée dans les extraits est indiquée.

Comme montré sur la figure 58, les complexes télomériques contenant la version MS2 de l'ARN *TLC1* reconstituent l'activité télomérase de la même manière que la version

sauvage de cette enzyme. Cette activité est bien dépendante de la présence de l'ARN *TLC1-10xMS2* puisqu'elle est perdue lors de traitement à l'ARNase.

Pour résumer cette section, nous avons montré que la version *TLC1-10xMS2* complémente parfaitement la délétion de *TLC1* en terme de sénescence, longueur des télomères, expression et activité catalytique.

Un dernier contrôle était cependant essentiel afin de montrer que les particules fluorescentes que nous observons en imagerie correspondent bien à la position de l'ARN de la télomérase *in vivo*. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un *FISH* sur nos constructions étiquetées MS2 (Fig. 59).



**Figure 59 :** la position des foci MS2-GFP visualisés dans les cellules vivantes correspond à la position de l'ARN *TLC1 in situ*.

Les cellules RWY11 exprimant soit un allèle sauvage soit notre construction *TLC1-10xMS2* + MS2-GFP ont été soumises au protocole de *FISH*. DAPI marquage nucléaire, barre de calibration=1µm.

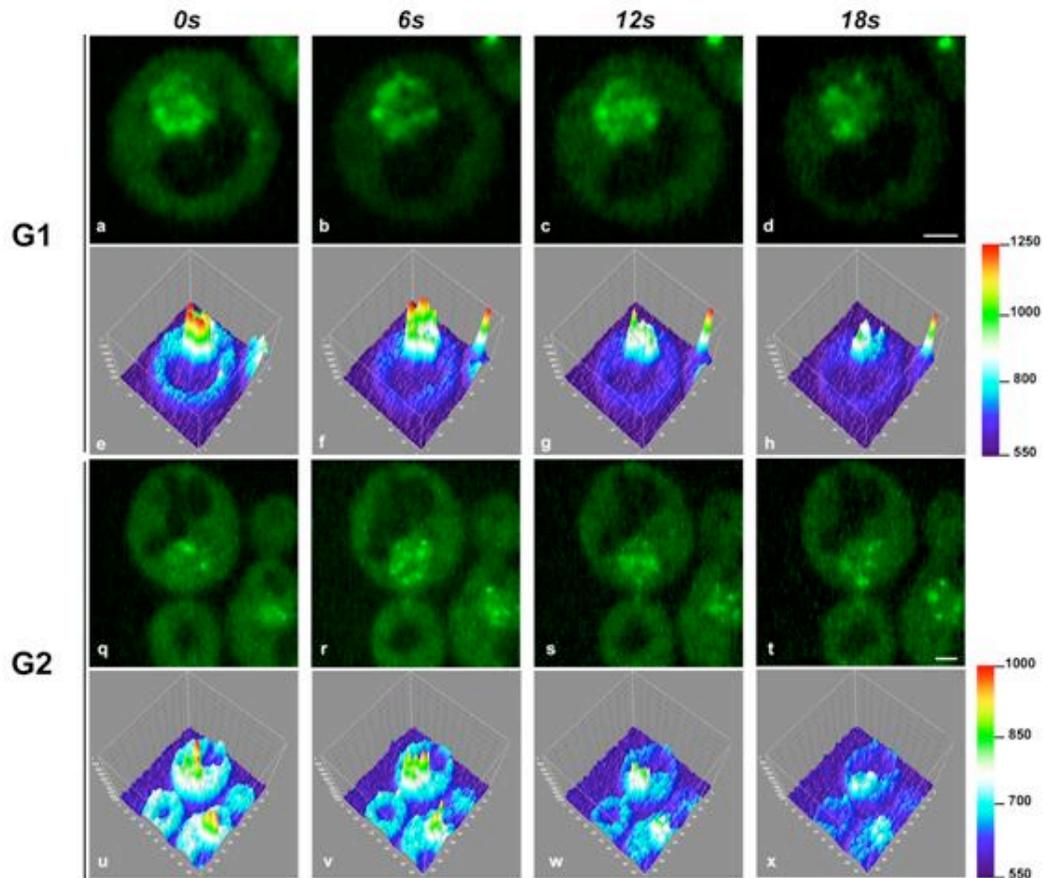
Les résultats montrent que la position des foci GFP observés en cellules vivantes co-localisent avec le signal produit par un *FISH* contre l'ARN *TLC1*. La position des foci GFP correspond donc bien à la position absolue de l'ARN *TLC1 in vivo*. En réalisant la même expérience dans des cellules sauvages, aucun foci n'est visualisable dans le canal GFP.

Finalement, nous avons utilisé cette construction afin de suivre la position de l'ARN *TLC1*, en temps réel, dans les cellules vivantes.

### **2.3 Dynamique de l'ARN *TLC1* en phase G1 et G2 du cycle cellulaire.**

Afin de déterminer la dynamique de l'ARN *TLC1* en cellules vivantes, nous avons utilisé un microscope très performant, situé au *Cell Imaging and Analysis Network* (CIAN, Université McGill). Le CIAN propose l'utilisation d'un microscope confocal à disque tournant doté d'une caméra ultra-sensible et hautement résolutive. Afin de détecter l'ARN *TLC1*, nous avons poussé le système jusqu'à ses limites (100% puissance laser, sensibilité maximale de la caméra). Néanmoins, dans les conditions d'imagerie que nous avons utilisé, la phototoxicité reste relativement faible, puisque les cellules sont capables de pousser normalement après imagerie. Les vidéos des films générés lors de l'acquisition sont fournies avec ce manuscrit.

Nous avons tout d'abord visualisé la dynamique de cet ARN dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire (Fig. 60).



**Figure 60 : dynamique de l'ARN *TLC1* dans les cellules vivantes en G1 et G2.**

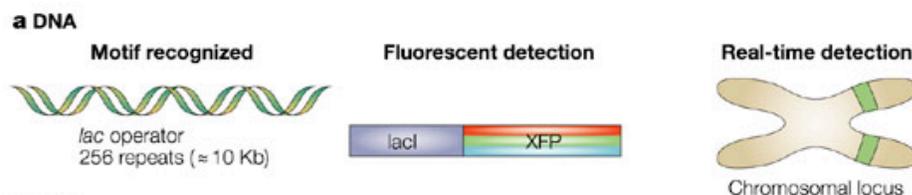
Des images issues des films (jointes en annexe) ont été extraites au temps indiqués. L'intensité de fluorescence des particules a été déterminée à l'aide du programme Image J (plug-in *interactive 3D surface plot*). Barre de calibration=1μm.

Les résultats montrent que l'ARN *TLC1-10xMS2* se déplace de façon très dynamique dans les cellules en phase G1 et G2 du cycle cellulaire. L'obtention de données quantitatives, en transformant le signal émis en unités de fluorescence, montrent que les foci d'ARN *TLC1* sont homogènes, suggérant le même nombre de molécules d'ARN par

focus. Ce nombre est possiblement un, puisque le nombre maximum de particules observées en mitose (supérieur à 25) est en accord avec le nombre attendu de molécules d'ARN *TLCI* détecté biochimiquement (29 molécules par cellules, (Mozdy & Cech, 2006).

Afin de mesurer de façon précise la dynamique de cet ARN *in vivo*, nous avons suivi les déplacements des particules en utilisant un *plug-in* du programme à code ouvert Image J. Ce *plug-in* est capable de suivre automatiquement, après détection des particules, la position de celle-ci en fonction du temps. Des données comme la vitesse, le déplacement moyen et le coefficient de diffusion peuvent ensuite être extraites mathématiquement.

Cependant, les paramètres physiques de l'ARN *TLCI* seul ne sont pas informatifs et nous avons voulu comparer la dynamique de cet ARN à la dynamique de son substrat, le télomère. Nous avons donc utilisé une souche étiquetée pour le télomère  $IV_R$  et suivi sa position au cours du temps. Nous avons suivi la position de ce télomère puisque la souche étiquetée a été gracieusement fournie par le laboratoire du Dr D'amours. La description du système utilisé pour détecter ce télomère *in vivo* est décrite dans la figure 61.



**Figure 61 : description du système utilisé pour détecter la position du télomère  $IV_R$  *in vivo*.**

256 répétitions de l'opérateur LacO ont été insérées en position sub-télomérique du bras droit du chromosome IV (souche *D307*). L'expression d'un rapporteur LacI-GFP, qui lie spécifiquement la séquence opératrice LacO, produit un focus détectable *in vivo*. Un variant de LacI incapable de tétramériser a été utilisé. Adapté de (Shav-Tal et al, 2004b).

Nous avons donc utilisé le système LacO/LacI-GFP pour détecter la position du télomère IV<sub>R</sub> et déterminer son comportement physique au cours du temps. Les données extraites pour l'ARN *TLC1* sont comparées à la dynamique de son substrat. Les résultats sont présentés sur la table 1.

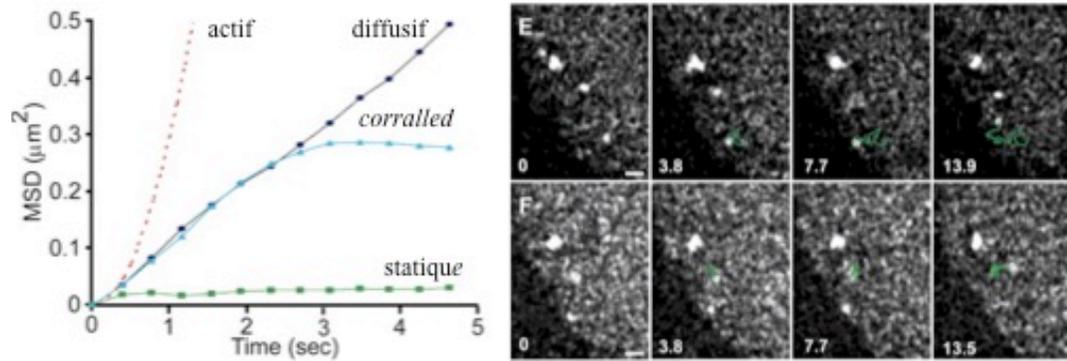
	# of particles	# of frames	Particle Velocity (nm/s)			Displacement (nm)			D (μm <sup>2</sup> /s)
			Min	Max	Avg	Min	Max	Avg	
<b>TLC1 G1</b>	15	367	335	729	499	67	177	118	0,0601
<b>TLC1 G2/M</b>	14	331	246	745	550	49	191	115	0,0523
<b>Tel IV<sub>R</sub></b>	10	1298	198	433	293	39	86	59	0,0098

**Table 1 : paramètres physiques des déplacements de l'ARN *TLC1* par rapport au télomère dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire.**

Le résultat du suivi des particules d'ARN *TLC1* montre qu'il se déplace à des vitesses indiquant un mode de déplacement diffusif en G1 et G2 (500nm/s) avec des coefficients de diffusion dans le même ordre de grandeur. Ces valeurs sont très proches de celles mesurées pour la vitesse de déplacement et le coefficient de diffusion d'un ARN messenger libre dans le noyau des cellules humaines (Fusco et al, 2003; Shav-Tal et al, 2004a). Si on compare cette dynamique à celle de son substrat, on peut voir que le télomère se déplace deux fois moins vite et à un coefficient de diffusion dix fois inférieur à celui de l'ARN de la télomérase. La vitesse du télomère IV<sub>R</sub> mesurée est en accord avec les vitesses obtenues dans des études précédentes (Bystricky et al, 2005).

Afin de préciser le mode de déplacement de l'ARN *TLC1*, nous avons réalisé des études de *Mean Square Displacement* (MSD). Ce type d'étude a déjà été réalisé pour les

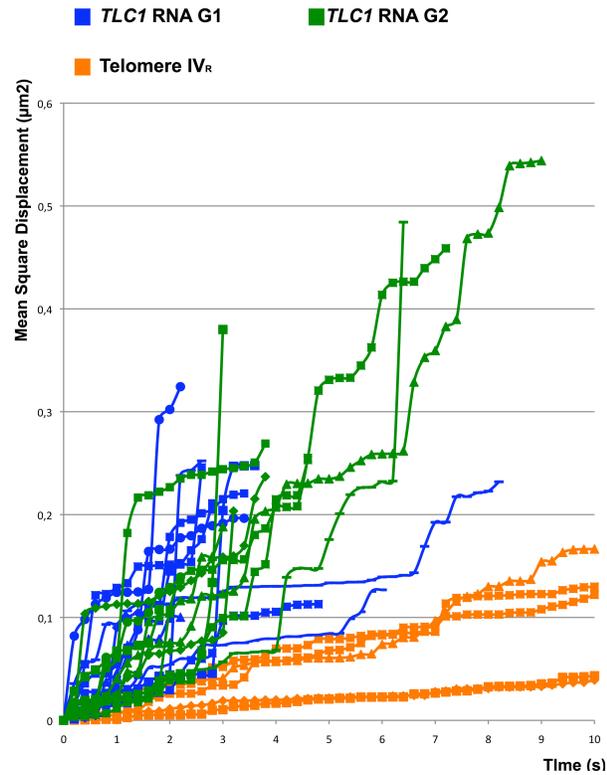
ARNm nucléaires chez l'humain, et quatre courbes de MSD typiques peuvent être obtenues (Fig. 62).



**Figure 62 : courbe de MSD idéales obtenues par des ARNm et exemples de trajectoires.**

A gauche, courbes idéales de déplacement obtenues pour des ARNm ayant des comportements actifs, diffusifs, corralled ou statiques. Le comportement statique ne montre pas ou peu de déplacement en fonction du temps, la courbe de MSD reste donc proche de l'axe du temps. Les deux comportements diffusifs, libre et corralled, montrent un déplacement progressif à partir du point d'origine. La diffusion corralled montre un fléchissement de la courbe lié à la diffusion dans un volume restreint. Le transport actif montre un fort déplacement dans un court laps de temps. A droite, trajectoire d'un ARNm diffusif (E) et corralled (F). Adapté de (Shav-Tal et al, 2004a).

Nous avons donc calculé les MSD pour l'ARN *TLC1* et pour son substrat, le télomère, en phase G1 et G2 du cycle cellulaire (Fig. 63).



**Figure 63 : MSD observé pour l'ARN *TLC1* en phase G1 et G2 du cycle cellulaire comparé au MSD du télomère  $IV_R$ .**

L'ARN *TLC1* montre un déplacement plus important comparé à son substrat. A notre connaissance, cette étude est la première montrant la diffusion d'un ARN dans le noyau des cellules de *S.cerevisiae*.

Comme précédemment décrit, le télomère a un déplacement très peu diffusif et quasi statique. Si on compare son déplacement à celui de l'ARN *TLC1*, on peut remarquer que tous les déplacements de cet ARN sont beaucoup plus diffusifs que le télomère. Certaines courbes montrent un comportement diffusif *corrallé* et d'autres diffusif libre. Ce résultat suggère que les mouvements de l'ARN *TLC1* ne sont pas contraints comme le sont ceux du télomère en G1 et G2. La possibilité d'une association stable entre le télomère et

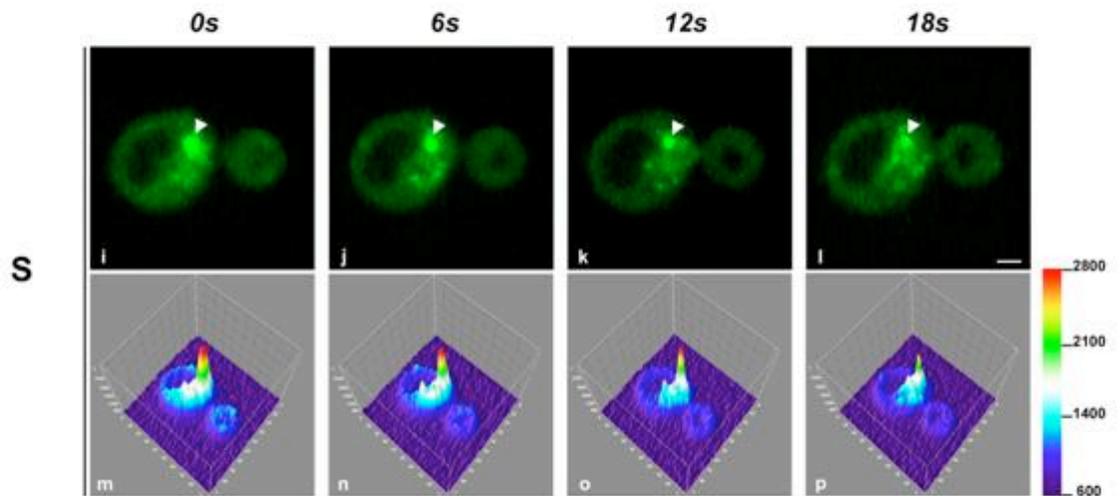
l'ARN *TLC1* en G1/G2 est donc faible, contrairement à ce qui a été précédemment proposé par ChIP et *FISH*.

Pour résumer cette section, nous avons montré que l'ARN *TLC1*, en cellules vivantes, a une dynamique très rapide, diffusive, et se déplace plus vite et de façon moins contrainte que son substrat, le télomère. L'homogénéité de fluorescence des foci de l'ARN *TLC1* suggère le même nombre de molécules d'ARN par foci (supposément une seule). Ces résultats suggèrent fortement l'absence d'interaction stable entre le télomère et la télomérase dans ces phases du cycle cellulaire.

Après avoir caractérisé la dynamique de l'ARN *TLC1* en G1/G2, nous nous sommes concentrés sur sa dynamique en phase S du cycle cellulaire, particulièrement en phase S tardive, où les télomères sont allongés.

## **2.4 Dynamique de l'ARN *TLC1* en phase S du cycle cellulaire.**

Nous savons que la télomérase est active en phase S et G2 du cycle cellulaire mais aucune observation directe d'une télomérase active *in vivo* n'a été réalisée. Dans le but d'observer des modifications du comportement de l'ARN *TLC1* lors de la réplication du télomère, nous avons suivi sa dynamique en phase S (Fig. 64).



**Figure 64 : dynamique de l'ARN *TLC1* dans les cellules vivantes en phase S tardive.**

Des images issues des films (jointes en annexe) ont été extraites au temps indiqués. L'intensité de fluorescence des particules a été déterminée à l'aide du programme Image J (plug-in *interactive 3D surface plot*). La pointe de flèche représente la position d'un regroupement de molécules d'ARN *TLC1*. Un enrichissement de 6 à 15 fois a été détecté dans ces gros foci, par rapport aux foci uniques diffusifs. Barre de calibration=1µm.

Les résultats montrent un comportement différent du comportement diffusif observé en G1/G2. En effet, nous pouvons observer l'apparition d'un regroupement d'ARN *TLC1* qui apparaît par la fusion de foci uniques. Ces foci ont une longue persistance (supérieure à 1 min). Après estimation de l'augmentation de fluorescence dans ces foci, nous avons déterminé que l'ARN *TLC1* y est enrichi de 6 à 15 fois. Ces foci représentent donc une forte augmentation locale de la concentration en télomérase.

Ces foci se déplacent très lentement comparé aux reste des foci d'ARN *TLC1* diffusif et sont très souvent proche de l'enveloppe nucléaire. Il est donc probable que ces gros foci représentent la télomérase active en train d'allonger les télomères. Nous avons

donc nommé ce nouveau regroupement nucléaire le T-rex, pour *Telomerase recruitment and extension*.

Si notre hypothèse est exacte et que les T-rex correspondent bien à une télomérase active en cours de réplication, différentes caractéristiques devraient être observées, qui sont énumérées dans les points suivants :

- les T-rex devraient avoir les mêmes caractéristiques que le télomère en terme de déplacement, vitesse et coefficient de diffusion.
- les T-rex devraient être prépondérants en fin de phase S et leur nombre en accord avec le nombre de télomères répliqués.
- les T-rex devraient colocaliser avec les télomères
- le nombre ou la persistance des T-rex devrait être modifiée en cas de délétion de régulateurs positifs et négatifs de la télomérase.
- le nombre de T-rex devrait être modifié si les télomères raccourcissent.

## **2.5 Le T-rex adopte le comportement du télomère en fin de phase S du cycle cellulaire.**

Dans le but de caractériser la dynamique des T-rex en fin de phase S du cycle cellulaire, nous avons déterminé leur vitesse, MSD, et comparé ces valeurs à celle du télomère  $IV_R$  (Table 2).

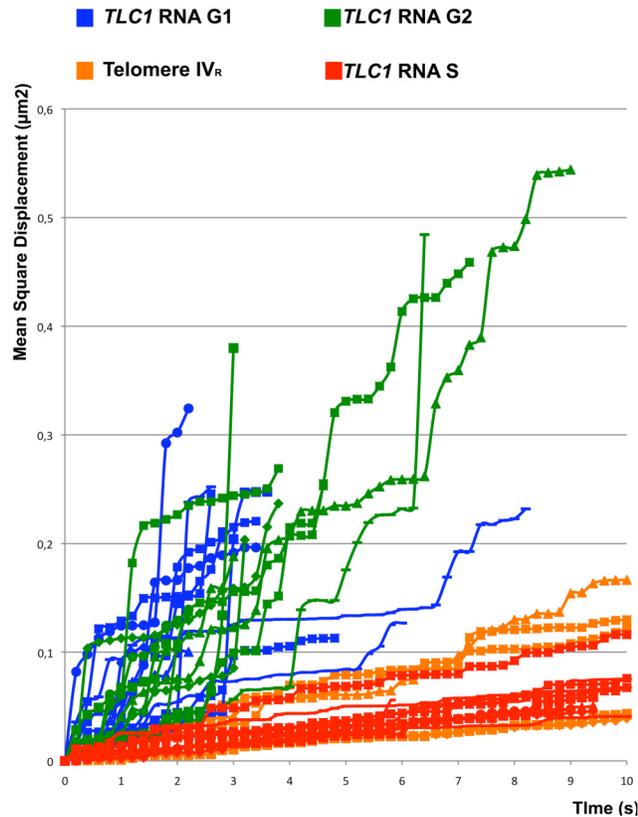
	# of particles	# of frames	Particle Velocity (nm/s)			Displacement (nm)			D ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )
			Min	Max	Avg	Min	Max	Avg	
<b><i>TLC1 S</i></b>	11	890	196	309	227	37	61	48	0,0069
<b><i>Tel IV<sub>R</sub></i></b>	10	1298	198	433	293	39	86	59	0,0098

**Table 2 : paramètres physiques des déplacements de l'ARN *TLC1* par rapport au télomère dans la phase S tardive du cycle cellulaire.**

Seulement les gros foci d'ARN *TLC1* (T-rex) ont été suivis dans cette phase.

Les gros foci d'ARN *TLC1* en phase S adoptent la même vitesse, les mêmes déplacements et montrent des coefficients de diffusion dans le même ordre de grandeur que ceux des télomères (Table 2).

Nous avons poursuivi en déterminant le MSD de ces T-rex (Fig. 65).



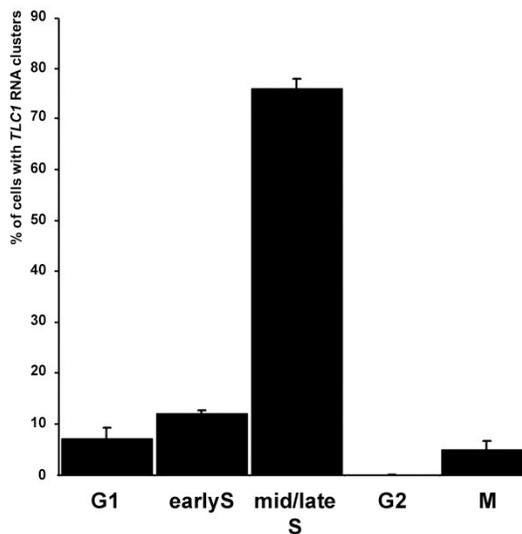
**Figure 65: MSD observé pour l'ARN *TLC1* en phase G1, G2 et S du cycle cellulaire comparé au MSD du télomère  $IV_R$ .**

L'ARN *TLC1* montre un déplacement plus important comparé à son substrat en G1/G2. En phase S, les gros foci d'ARN ont un déplacement identique par rapport au télomère  $IV_R$ .

Comme visualisé sur la figure 65, les gros foci d'ARN *TLC1* en phase S adoptent un comportement diffusif lent et toutes les courbes de déplacement sont situées à l'intérieur des courbes calculées pour le télomère  $IV_R$ . Ce résultat montre que les T-rex adoptent bien le comportement du télomère en fin de phase S en terme de vitesse, MSD et coefficient de diffusion. Nous pouvons donc proposer que l'ARN *TLC1* se regroupe sous forme de T-rex qui sont stablement associés aux télomères en phase S tardive du cycle cellulaire. Nous avons alors vérifié leur distribution en fonction du cycle cellulaire.

## 2.6 L'apparition de T-rex est restreinte à la fin de la phase S et entre un et trois foci peuvent être détectés *in vivo*.

Si les T-rex correspondent bien à une télomérase active, ils devraient s'accumuler en fin de phase S du cycle cellulaire. Nous avons donc mesuré la distribution des T-rex au cours du cycle (Fig. 66).

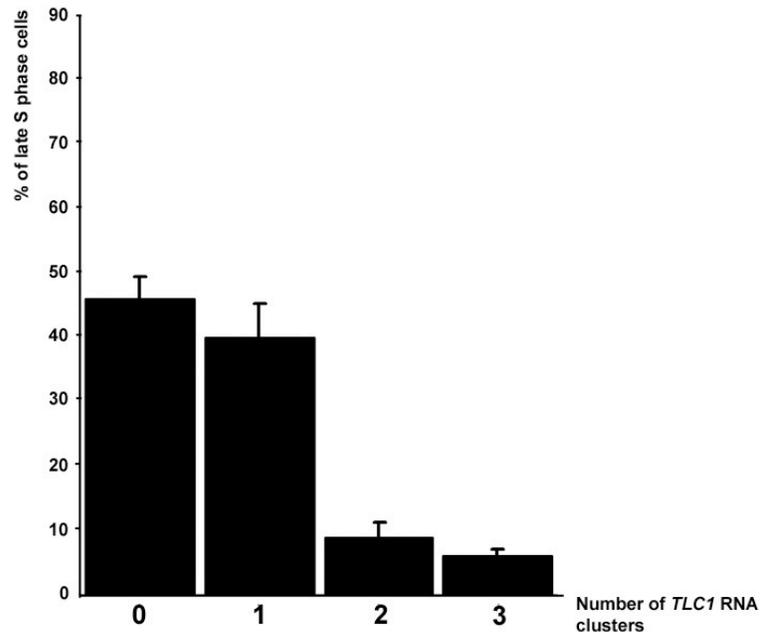


**Figure 66 : étude de la distribution des T-rex au cours du cycle cellulaire.**

50 cellules de chaque phase du cycle ont été comptées pour la présence d'au moins 1 T-rex dans trois expériences indépendantes.

Comme montré sur ce graphique, on peut voir une forte accumulation de T-rex en milieu/fin de phase S du cycle cellulaire. Même si les T-rex peuvent se former dans les autres phases du cycle, ils ne seront pas stabilisés et disparaissent très rapidement

(persistent moins de 3s). En regardant particulièrement les cellules en fin de phase S, nous avons pu observer la présence de multiples T-rex dans certaines cellules (Fig. 67).



**Figure 67 : plusieurs T-rex peuvent être détectés dans le noyau des cellules sauvages en phase S tardives.**

50 cellules en phase S tardive ont été comptées pour la présence d'un ou de plusieurs T-rex dans trois expériences indépendantes.

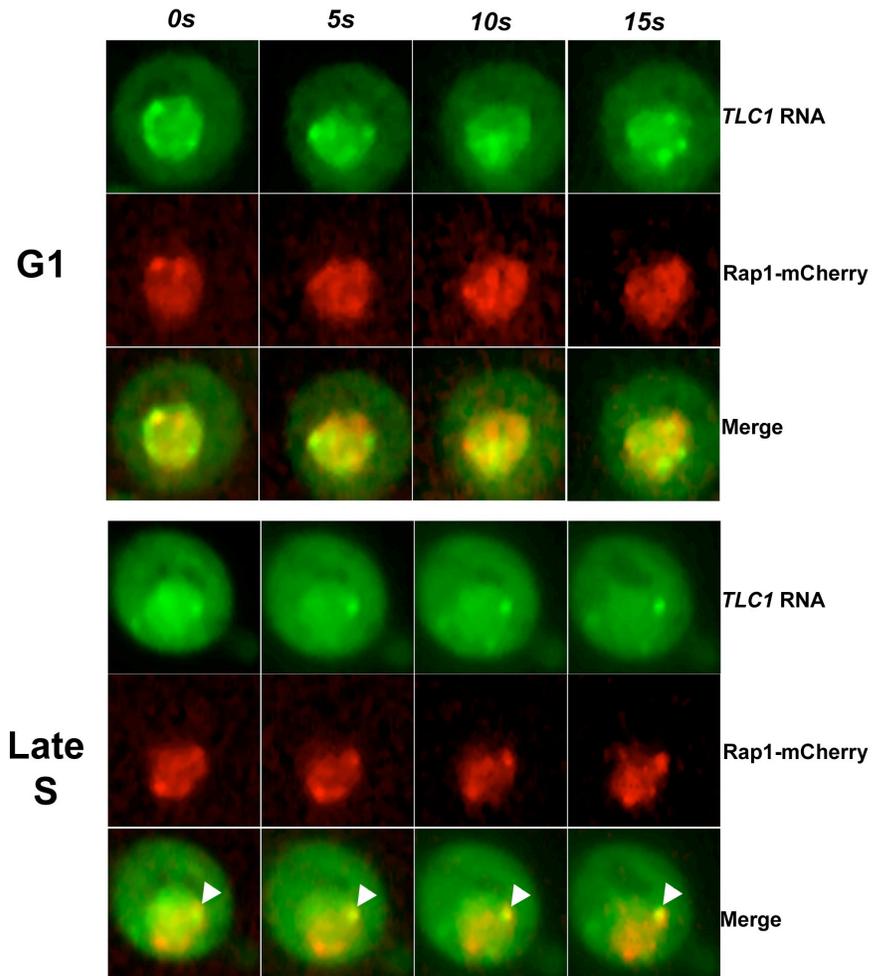
Le graphique montre que 55% des cellules en fin de phase S possèdent au moins un T-rex dans leur noyau, alors que certaines peuvent en avoir 2 ou 3 maximum. Si on considère que 10% des télomères sont répliqués à chaque cycle cellulaire (32 télomères chez *S.cerevisiae*) (Teixeira et al, 2004), on devrait avoir entre 1 et 3 évènements de réplication télomérique. Le nombre de T-rex observé est en accord avec ce point.

Nous avons donc montré dans cette partie qu'entre 1 et 3 T-rex peuvent être observés dans le noyau des cellules et que leur accumulation est maximale en milieu/fin S du cycle cellulaire.

Nous avons poursuivi en essayant de colocaliser les T-rex avec les clusters télomériques *in vivo*.

## **2.7 Les T-rex colocalisent stablement avec les foci télomériques en phase S tardive du cycle cellulaire.**

Dans le but de visualiser une association stable entre les T-rex et les télomères, nous avons construit une souche qui porte une version étiquetée fluorescente de la protéine Rap1p. Nous avons utilisé un variant d'une meilleure efficacité quantique que la RFP, *mCherry*. La construction Rap1-*mCherry* montre entre 4 et 8 foci à l'intérieur des noyaux des cellules, un nombre en accord avec le nombre de regroupements télomériques *in vivo* (Palladino et al, 1993). Nous avons ensuite réalisé une acquisition multi-couleur, en temps réel, des télomères et de l'ARN *TLC1* (Fig. 68).



**Figure 68 : l'ARN *TLC1* est associé aux télomères uniquement en phase S tardive *in vivo*.**

Une acquisition multi-couleurs a été réalisée sur des cellules en phase G1 et S du cycle cellulaire. La pointe de flèche montre une colocalisation stable entre un T-rax et un regroupement télomérique.

Les résultats montrent tout d'abord que l'ARN *TLC1* n'est pas stablement associé aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire, comme suggéré par les expériences de suivi des particules *in vivo*. Cependant, en fin de phase S, nous avons pu visualiser un T-rax associé stablement avec un regroupement télomérique. Ces résultats confirment notre

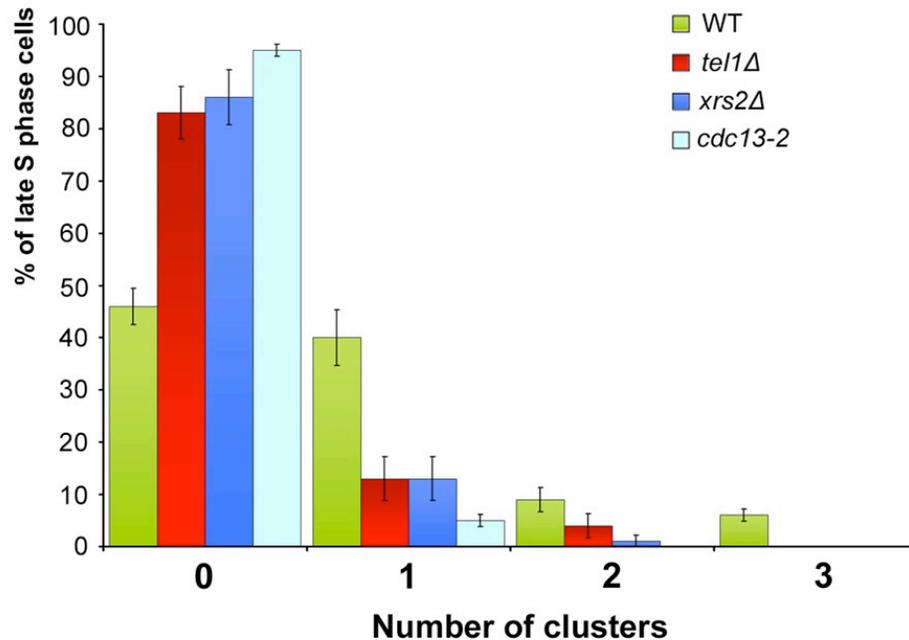
hypothèse suggérant que les T-rex représentent la forme active de la télomérase en cours de réplication.

Nous avons ensuite tenté de déterminer si la pénétrance des T-rex dépendait de l'activité télomérase.

## **2.8 La pénétrance des T-rex est modifiée en cas d'altération de l'activité télomérase.**

Comme décrit dans la section introduction, différents régulateurs positifs et négatifs contrôlent le recrutement de la télomérase aux télomères. Parmi ceux-ci, Tel1p et le complexe MRX jouent un rôle clé dans le recrutement préférentiel de la télomérase aux télomères courts. Cependant, même si ces facteurs sont requis pour recruter la télomérase aux télomères, les cellules ne montrent pas de phénotype de sénescence et les télomères sont très courts mais stables. Il est possible qu'un recrutement basal de la télomérase puisse maintenir ces télomères courts. Une autre mutation dans la protéine Cdc13p, l'allèle *cdc13-2*, abolit complètement le recrutement de la télomérase aux télomères, en empêchant l'interaction Cdc13p-Est1p. Cette mutation conduit à un phénotype de sénescence et empêche complètement l'élongation des télomères (Lendvay et al, 1996). D'un autre côté, le complexe Rif1p/Rif2p est nécessaire à l'inhibition de l'activité télomérase quand le télomère atteint une longueur acceptable. Sa délétion entraîne un phénotype d'hyperélongation des télomères.

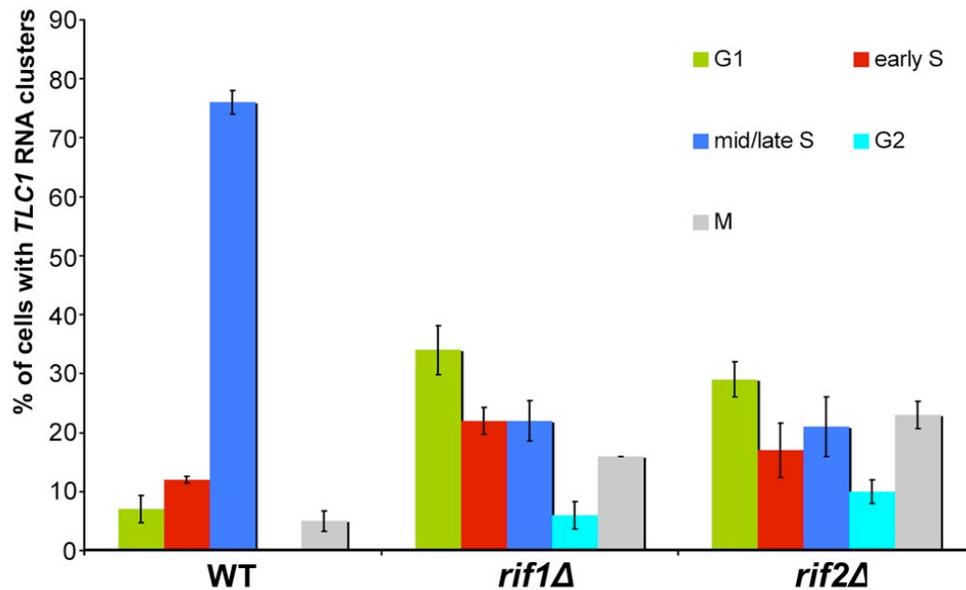
Nous avons donc visualisé les proportions de T-rex dans les mutants  $\Delta TEL1$ ,  $\Delta XRS2$ , *cdc13-2* et  $\Delta RIF1/\Delta RIF2$  (Fig. 69/70).



**Figure 69 : un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères diminue fortement le taux de formation de T-rex en phase S tardive.**

50 cellules en phase S tardives pour chaque mutant ont été comptées pour la présence d'un ou de plusieurs T-rex dans trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que là où les cellules sauvages présentent un nombre normal de T-rex à l'intérieur du noyau des cellules en fin de phase S. Leur nombre est modifié dans les mutants  $\Delta TEL1$  et  $\Delta XRS2$ , avec une réduction du nombre de T-rex en fin de phase S. Ce phénotype est exacerbé dans les mutants *cdc13-2*, où 94% des cellules en phase S tardive ne possèdent pas de T-rex. De manière très intéressante, les mutants Rif entraînent un phénotype totalement différent.



**Figure 70 : la délétion des régulateurs négatifs *RIF1* et *RIF2* abolit la régulation de la formation des T-rex en fonction du cycle cellulaire.**

50 cellules en phase S tardives pour chaque mutant ont été comptées pour la présence d'un ou de plusieurs T-rex dans trois expériences indépendantes.

Alors que les cellules sauvages montrent une forte proportion de T-rex en fin de phase S du cycle cellulaire, les mutants  $\Delta RIF1$  et  $\Delta RIF2$  montrent un défaut d'accumulation en fin de phase S. En effet, des T-rex peuvent être visualisés dans toutes les phases du cycle cellulaire dans ces mutants. Ce résultat suggère que les protéines Rifp participent à la restriction de l'apparition des T-rex en fonction du cycle cellulaire.

En prenant en compte tous les résultats de la localisation de l'ARN *TLC1* *in vivo* en fonction du cycle cellulaire, nous avons pu proposer un modèle de l'interaction télomère/téломérase au cours du cycle qui sera présenté dans la section discussion (Fig. 73).

## **DISCUSSION**

Le contrôle de la longueur des télomères est un processus essentiel au développement contrôlé des cellules. La dérégulation de ce mécanisme s'accompagne d'une prolifération cellulaire anarchique et joue un rôle primordial dans le processus de cancérisation. De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans la maintenance télomérique sera un atout puissant pour lutter contre le développement et la progression des cancers. Même si des thérapies anticancéreuses ciblant la télomérase ou son substrat sont en cours de développement, certains points clés dans la biogenèse de cette enzyme restent mal compris. En effet, peu de choses sont connues quant à son trafic intracellulaire *in situ* comme *in vivo*.

Dans le but de mieux comprendre les voies de biogénèse, de maturation et de recrutement de la télomérase aux télomères, nous avons utilisé la levure *S.cerevisiæ* comme modèle d'étude afin de suivre le composant limitant de la télomérase, en localisant son composant ARN. Nous avons combiné des approches *in situ* et *in vivo* afin de disséquer de la production jusqu'à l'ancrage aux télomères. Par notre étude, la localisation de la télomérase aux télomères en cellules fixées et vivantes a été visualisée pour la première fois.

## **1. L'ARN *TLC1* colocalise avec les télomères *in situ*.**

Nous avons pu montrer la localisation endogène de l'ARN *TLC1 in situ*. La réalisation d'un *FISH* dans des cellules  $\Delta$ *TLC1* a montré la spécificité de notre méthode (Fig. 30). Nous avons identifié la localisation de cet ARN dans des cellules sauvages, où il se regroupe sous la forme de 6 à 10 foci qui colocalisent avec les télomères en phase G1/S du cycle cellulaire (Fig. 34). Ce type d'association a été confirmé par des travaux de ChIP qui ont montrés un enrichissement très important de la sous-unité catalytique Est2p aux télomères dans ces mêmes phases (Taggart et al, 2002). La délétion de facteurs impliqués dans le regroupement des télomères a montré que l'ARN *TLC1* est toujours associé à ceux-

ci même en cas de dispersion (Fig. 35), suggérant une association stable entre le télomère et la télomérase. Notre expérience a été la première visualisation directe de la télomérase endogène localisée sur son substrat.

## **2. Un assemblage hiérarchique de la télomérase contrôle la qualité des complexes enzymatiques produits.**

Il est envisageable d'admettre qu'un ARN qui fonctionne dans le noyau serait synthétisé dans celui-ci et y résiderait sans jamais avoir une phase cytoplasmique au cours de sa maturation. Néanmoins, ce n'est pas le cas pour l'ARN *TLC1*. En effet, nous avons pu mettre en évidence une accumulation cytoplasmique de cet ARN dans les cellules délétées pour les *ESTs* ou des facteurs d'ancrage yKu70/80p (Fig. 36/37). De même, la délétion de la tige de fixation du complexe yKu70/80p sur l'ARN *TLC1* a entraîné le même phénotype. Cette localisation suggère donc que l'ARN *TLC1* possède une phase cytoplasmique au cours de sa biogénèse, comme il avait été proposé dans des études précédentes (Ferrezuelo et al, 2002; Teixeira et al, 2002). D'autres ARN de la classe des snARN ont également été identifiés comme possédant une phase cytoplasmique chez la levure, même si ces travaux sont encore controversés à l'heure actuelle (Olson & Siliciano, 2003).

*Quels sont les avantages d'avoir une phase de maturation cytoplasmique pour un ARN fonctionnant dans le noyau ?*

Nous savons que la séparation spatiale des mécanismes de transcription et de traduction par l'apparition de l'enveloppe nucléaire a entraîné un nouveau niveau de régulation de l'expression des gènes, mais a également été source de problèmes pour les

cellules. En effet, elles ont du développer et sélectionner des systèmes permettant un import/export nucléaire efficace afin de coordonner les activités nucléaires et cytoplasmiques. Dans le cas de l'ARN *TLC1*, l'enveloppe nucléaire va séparer physiquement les complexes télomérasiques en cours d'assemblage de son substrat télomérique localisé dans le noyau. De plus, un défaut d'assemblage de cette enzyme entrainera sa rétention cytoplasmique. Le mécanisme de trafic nucléo-cytoplasmique pour l'ARN *TLC1* présenterait donc l'avantage de servir de contrôle de qualité afin de vérifier l'assemblage correct de cette enzyme. Ce type de contrôle de qualité est déjà observé pour les mécanismes d'export nucléaire où, dans le cas de défaut d'épissage par exemple, les ARN mal épissés ne seront pas exportés (Revue dans (Schmid & Jensen, 2008)). Dans la même idée, un mécanisme similaire a déjà été identifié pour les sous-unités ribosomiques, ou un contrôle de qualité s'assure de la maturation correcte des ARNr (Good et al, 1997).

L'accumulation cytoplasmique de l'ARN *TLC1* préviendrait donc la localisation aux télomères de complexes télomérase mal assemblés. Ces complexes pourraient agir comme forme dominante négative ou comme forme constitutivement active de la télomérase. Les conséquences de tels variants seraient dramatiques pour l'homéostasie des télomères. La phase cytoplasmique de l'ARN *TLC1* nous apparaît donc comme un nouvel atout pour la régulation de la longueur des télomères. Cependant, une hypothèse lors de notre étude était que les complexes télomérase mal assemblés ne pouvaient pas être recrutés aux télomères et que ce défaut de recrutement entraînait un export nucléaire, afin d'éviter la compétition entre les formes mal assemblées et actives. Nous avons réfuté cette idée en montrant en condition endogène sauvage que l'ARN *TLC1* fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Fig. 44), même si l'ancrage de la télomérase participe à sa rétention nucléaire (Fig. 41/42).

L'effet observé pour la localisation endogène de l'ARN *TLC1* est fondamentalement différent de celui observé pour sa forme surexprimée (Ferrezuelo et al, 2002). En effet, dans l'article de Ferrezuelo et al., la délétion de *EST1*, 2 et 3 dans la même

souche n'entraînait pas de défaut de localisation de l'ARN *TLC1*. Cependant, c'est la forme immature polyA+ qui s'accumule dans le noyau des cellules. Il est possible que la surexpression de cet ARN titre un facteur important pour sa maturation dans les étapes précoces (peut être l'hyperméthylation par Tgs1p), bloquant son export nucléaire.

Nous avons donc montré pour la première fois que, en plus de leur fonction catalytique pour l'élongation des télomères, les protéines Estp et yKu70/80p participent à la détermination de la localisation intracellulaire de la télomérase. Des études de séquences d'import/export sur ces protéines ont montré une séquence NLS consensus dans le complexe yKu70/80p qui devrait avoir une liaison très forte pour son importine (Mtr10p/Kap122p). D'après nos expériences de complémentation, seule la délétion du facteur yKu ne peut être complétée par la surexpression des autres composants du complexe. Ce résultat suggère que yKu serait le facteur majeur nécessaire à la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*.

*Pourquoi alors la surexpression de EST1 et EST2 restaure dans certains cas la localisation nucléaire de l'ARN TLC1 ?*

Une des réponses pour expliquer ce phénomène serait que l'assemblage de la télomérase dans le cytoplasme est hiérarchique. La fixation de la première Estp favoriserait la fixation des autres Estp en cascade, ce qui aboutirait à la fixation du complexe yKu. La fixation du complexe yKu serait l'étape critique pour la localisation nucléaire de l'ARN *TLC1*. D'après notre étude, les facteurs Est1p et Est2p seraient les premiers facteurs à être liés sur l'ARN *TLC1*. Suite à cette liaison, il favoriserait l'interaction de Est3p avec le complexe. En effet, la surexpression des Est1p et 2p dans un mutant *EST3* a un phénotype de restauration partiel (Fig. 40), indiquant que Est3p serait nécessaire pour les étapes tardives de l'assemblage. Certains travaux suggèrent également que la protéine Est1p favorise la liaison de la protéine Est3p sur la télomérase (Hsu et al, 2007). On sait de plus que Est3p a une activité hélicase qui démasquerait peut être la tige de fixation de yKu sur l'ARN *TLC1*. Ce type d'assemblage hiérarchique assumerait les fonctions de contrôle de

qualité requises pour l'import nucléaire de complexes télomérasiques correctement assemblés.

Un mécanisme similaire a été proposé pour le complexe télomérase de *C.albicans* mais aucune preuve directe *in situ* n'a été apportée. En effet, le laboratoire de Neal Lue a réussi à reconstituer une activité télomérase en mélangeant des extraits cellulaires de cellules délétées pour *EST1* et *EST3*. Ce résultat indique que ces facteurs sont capables de s'assembler *in vitro* sur l'ARN *TER1* de *C.albicans*. Leur étude a été poursuivie en confirmant les travaux d'une autre équipe qui a montré que Est3p nécessitait la présence de Est1p pour s'associer sur l'ARN *TLC1*. Cependant, l'association de Est1p sur *TLC1* chez *S.cerevisiae* n'est pas Est3p dépendante, contrairement à la télomérase de *C.albicans* (Hsu et al, 2007; Hughes et al, 2000).

En associant nos résultats à ceux des laboratoires de Lue et Friedman, nous proposons qu'un assemblage hiérarchique de la télomérase dans le cytoplasme s'assure de la qualité des enzymes synthétisées. Ce mécanisme possède une relation directe avec les capacités de maintenance télomérique et donc de potentiel réplicatif des cellules. Ce processus de contrôle d'assemblage s'assurerait qu'une télomérase fonctionnelle est produite par les cellules afin d'assurer la pérennité de l'espèce à long terme.

Malgré tout, il faut se rappeler que l'expérience de complémentation a été réalisée en condition de surexpression et que les mécanismes observés peuvent être différents lorsque les protéines sont exprimées en condition endogène. Cet effet doit également être exacerbé due à la faible concentration des protéines Estp *in vivo*.

### **3. *TLC1* fait la navette entre le noyau et le cytoplasme.**

Notre étude montre également pour la première fois l'importance des voies Crm1p et Mtr10p/Kap122p pour le trafic de la forme endogène de l'ARN *TLC1*. Nous avons montré que cet ARN est exporté par une nouvelle voie Crm1p dépendante de manière indépendante de la voie d'export des ARNr. Néanmoins, il est possible que l'inhibition de l'export soit liée à un effet génétique et nous n'avons pas d'évidence d'une liaison directe entre l'ARN *TLC1* et la machinerie d'export.

Une question importante reste encore en suspens: *quel facteur fait le lien entre l'ARN TLC1 et l'exportine Crm1p ?*

Chez l'humain, hCRM1 possède différentes fonctions dans la cellule. Comme décrit précédemment, hCRM1 est responsable de l'export des ARNr et des snARN chez l'humain (Kohler & Hurt, 2007). Pour exporter les snARN, hCRM1 lie l'adaptateur PHAX, une protéine qui lie les snARN immatures et qui sert d'adaptateur avec la machinerie d'export (Boulon et al, 2004). Cependant, il n'existe pas d'homologue de PHAX chez la levure. Déterminer quel facteur fait le lien entre Crm1p et l'ARN *TLC1* sera une question très intéressante à explorer dans le futur. De plus, hCRM1 a des fonctions nucléaires strictes en plus de son implication dans le trafic nucléocytoplasmique. Cette protéine est responsable de la localisation intranucléaire de snoARN, notamment U3, en les transportant entre corps de Cajal et nucléoles (Boulon et al, 2004).

Une des différences entre les ARN *hTR* et *TLC1* repose sur le fait que *hTR* apparaît comme un ARN nucléaire strict. En effet, l'équipe du Dr Terns a vérifié la localisation de *hTR* lors de son injection dans le cytoplasme d'ovocyte de Xénope et n'a pas pu détecter d'import nucléaire par fractionnement nucléo-cytoplasmique (Lukowiak et al, 2001). Cependant, des précautions sont à prendre en interprétant cette expérience. En effet, ils ont utilisé une forme de *hTR* transcrite *in vitro* et micro-injectée dans le cytoplasme. Cet ARN transcrit *in vitro* ne possédera donc pas de CAP tri-méthylé, ce qui, comme nous l'avons montré, peut influencer grandement sur la localisation intracellulaire des ARN non-codants

(Fig. 53 et Verheggen et al, 2002). De plus, ces cellules sont arrêtées en méiose (prophase 1), ce qui pourrait modifier le trafic intracellulaire des ARNs.

L'équipe du Dr Terns a montré qu'une délétion du domaine H/ACA de *hTR* entraîne l'export nucléaire de cet ARN (Lukowiak et al, 2001). Il serait alors intéressant de regarder si des mutations dans la dyskérine (impliqué dans la *diskeratosi congenita*, liant le domaine H/ACA) entraîne une accumulation cytoplasmique de *hTR*, empêchant ainsi l'élongation des télomères. Néanmoins, ce résultat souligne l'existence d'un mécanisme d'export nucléaire de *hTR*. Même si l'absence de trafic nucléocytoplasmique de *hTR* est confirmée, il est possible que hCRM1 soit un des facteurs participant à son trafic intranucléaire. Nous avons vu que le trafic de *hTR* est également très complexe et régulé en fonction du cycle cellulaire. Déterminer si hCRM1 est impliqué dans ce trafic reste une question sans réponse jusqu'à aujourd'hui.

Notre étude sur la collection de mutants des importines de *S.cerevisiæ* a confirmée l'implication de Mtr10p dans l'import nucléaire de l'ARN *TLC1*. Nous avons également découvert que l'importine Kap122p participe à l'import de cet ARN, même si l'effet de sa délétion est moins important que celui de Mtr10p. Il est possible que plusieurs importines soient capable d'importer les complexes télomérasiques, comme c'est le cas pour les protéines ribosomales par exemple. Cette interdépendance s'assure de la localisation nucléaire en cas de défaut d'une voie d'import.

#### **4. L'hyperméthylation de la coiffe serait essentielle à la localisation de l'ARN *TLC1*.**

Au cours de ce travail, nous avons également montré que c'est la forme mature de l'ARN *TLC1* (coiffe tri-méthylée, polyA-) qui est exportée dans le cytoplasme. Il serait intéressant de savoir pourquoi la forme mature est exportée et non pas une forme précurseur.

Une partie de la réponse vient d'un travail de l'équipe de R. Rhoads sur la traduction d'ARN contenant différents variants structuraux de la coiffe (Cai et al, 1999). En effet, dans cette étude, les taux de traduction *in vitro* d'ARNm possédant différents variants de coiffe ont été mesurés. Il apparaît que la présence d'une coiffe tri-méthylée réduit de plus de 20 fois les capacités de traduction des ARN par les ribosomes.

Notre étude suggère donc que la forme mature tri-méthylée de la coiffe de l'ARN *TLC1* empêcherait sa reconnaissance par la machinerie de traduction, le rendant donc non-traductible. Si cet ARN était traduit, tout d'abord il serait piégé dans le cytoplasme par la machinerie traductionnelle. De plus, la plus grande ORF détecté dans *TLC1* ne fait que 9AA. A cause de la faible concentration en ARN *TLC1* dans la cellule, l'inhibition de sa capture par la machinerie de traduction lors de sa phase cytoplasmique serait une condition très importante pour son accumulation nucléaire. Il est possible que ce mécanisme soit commun à tous les ARN contenant des coiffes tri-méthylées.

Néanmoins, la nécessité de la présence d'une coiffe tri-méthylée et l'adaptateur faisant le lien entre Crm1p et l'ARN *TLC1* seront des points intéressants à étudier dans la poursuite du projet.



Dans ce modèle, l'ARN *TLC1* (en rouge) est transcrit par l'ARN pol II, il va donc être coiffé et poly-adénylé. Il est ensuite localisé dans le nucléole, où il acquiert une coiffe tri-méthylée par l'action de la protéine Tgs1p et perd sa queue polyA suite à la fixation de protéines Sm. Cet ARN sera ensuite exporté dans le cytoplasme par une voie Crm1p-dépendante, s'assemblera en complexe ribonucléoprotéique, puis sera réimporté par une voie dépendante des importines Kap122p/Mtr10p. Suite à l'import, le complexe télomérase correctement assemblé sera recruté aux télomères par l'action de Tellp et du complexe MRX. Nous proposons que l'ARN *TLC1* a des caractéristiques communes avec la voie de biogenèse des snARN humains (Revue dans (Gallardo & Chartrand, 2008; Gallardo & Chartrand, 2009)).

Finalement, notre étude démontre l'importance du trafic nucléo cytoplasmique pour l'assemblage et la maturation de la télomérase de *S.cerevisiae* et fournit une perspective différente de notre vision de la maintenance télomérique dans cet organisme.

## **6. Le comportement de l'ARN *TLC1* *in vivo* est fondamentalement différent de sa localisation dans les cellules fixées.**

D'après les résultats de *FISH* et de ChIP, il a été proposé que la télomérase est associée de manière stable aux télomères en phase G1/S du cycle cellulaire, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail. Ce modèle implique qu'au moins une télomérase serait associé au télomère de façon stable. Cependant, certaines observations sont en désaccord avec ce point.

Le laboratoire du Dr Lingner a créé une élégante méthode afin de déterminer les événements d'élongation intervenant sur un seul télomère, notamment si une seule télomérase ou plusieurs peuvent être recrutées sur un seul télomère en cours d'élongation.

Ce STEX (*Single Telomere Extension Assay*) est très utile pour déterminer l'activité catalytique et la processivité de la télomérase sur un seul télomère (Teixeira et al, 2004). Ils ont utilisé pour cette expérience deux versions de *TLC1*, une sauvage et une ayant une matrice modifiée (*tlc1-tm*). L'utilisation de *tlc1-tm* pour l'extension du télomère va induire l'intégration d'une séquence télomérique modifiée aisément détectable par PCR et séquençage. Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer qu'à la fois les formes sauvages et *tm* pouvaient être utilisées au cours d'un seul évènement d'élongation télomérique. Ce résultat suggère donc qu'un échange de télomérase intervient aux télomères en élongation et va à l'encontre du modèle proposant qu'une seule télomérase allonge un télomère spécifiquement.

Dans notre étude de suivi des particules télomérase, nous avons pu confirmer le fait que la télomérase n'est pas associée de manière stable aux télomères *in vivo*. En effet, l'ARN *TLC1* se déplace beaucoup plus vite que le télomère en phase G1 et son coefficient de diffusion est bien plus important. De plus, l'imagerie *in vivo* de la localisation des télomères et de la télomérase ne montre pas d'association stable entre le télomère et cette enzyme en phase G1.

*Quelle est donc la nécessité d'empêcher l'interaction stable entre le télomère et la télomérase en phase G1 du cycle cellulaire ?*

Une des possibilités est que l'interaction stable entre la télomérase et le télomère en G1 induise un phénotype d'hyper élongation des télomères. Nous savons que la sous-unité Est1p est dégradée dans cette phase du cycle et que sa concentration maximale est en phase S tardive, au moment de la réplication du télomère (Osterhage et al, 2006). Cependant, il est possible que la télomérase ait une activité basale sans Est1p. En effet, lors de la purification de complexes télomériques et d'essais d'extension *in vitro*, seulement la sous-unité Est2p et l'ARN *TLC1* sont nécessaires pour produire un tour d'élongation, correspondants à la taille de la matrice de *TLC1* (11nt). De ce fait, il est possible que

l'interaction stable en G1 induit des tours d'élongation des télomères, correspondant à la taille de la matrice de l'ARN *TLC1*, de manière non-contrôlée. L'inhibition de l'interaction stable entre la télomérase et son substrat éviterait donc l'activation non-contrôlée de cette enzyme.

## **7. L'ARN *TLC1* se regroupe sous la forme de T-rex, de nouveaux corps nucléaires représentant une télomérase active en élongation.**

Nous avons poursuivi notre étude en regardant la localisation de l'ARN *TLC1* en phase S tardive. Nous avons détecté la formation d'un nouveau corps nucléaire, enrichi de 6 à 15 fois en ARN *TLC1*, que nous avons appelé le T-rex. Ces T-rex représentent une forme active de la télomérase puisqu'ils colocalisent avec les télomères et que leur proportion est modifiée lors d'altération de la régulation positive ou négative de cette enzyme.

Le laboratoire du Dr Neil Lue a montré par étude biochimique que la télomérase n'est pas une enzyme processive chez *S.cerevisiae*. En effet, en regardant les taux d'extension *in vitro*, ils se sont rendu compte que la télomérase n'allonge son substrat télomérique que de 11nt, ce qui correspond à la longueur de la matrice de l'ARN *TLC1* (Singer & Gottschling, 1994). Des cycles d'élongation et ré-initiation sont donc peu probables *in vitro*. Il est possible que lors de la purification, des facteurs de processivité soient perdus. Cependant, une autre étude du laboratoire de Freeman a montré que la protéine Est1p participe à l'activité d'élongation de la télomérase (DeZwaan & Freeman, 2009). Cependant, même si on ajoute les protéines Est1p et Est3p purifiées au complexe Est2p-ARN *TLC1*, sa processivité reste la même. En effet, le nombre de nt ajouté reste identique même si cette enzyme reconstituée est capable d'allonger plus de substrat télomériques (DeZwaan & Freeman, 2009).

En reprenant les études du laboratoire des laboratoires du Dr Lingner, Lue et Freeman, une question se pose: *pourquoi une telle augmentation de concentration locale en télomérase sur les télomères en cours d'élongation in vivo?*

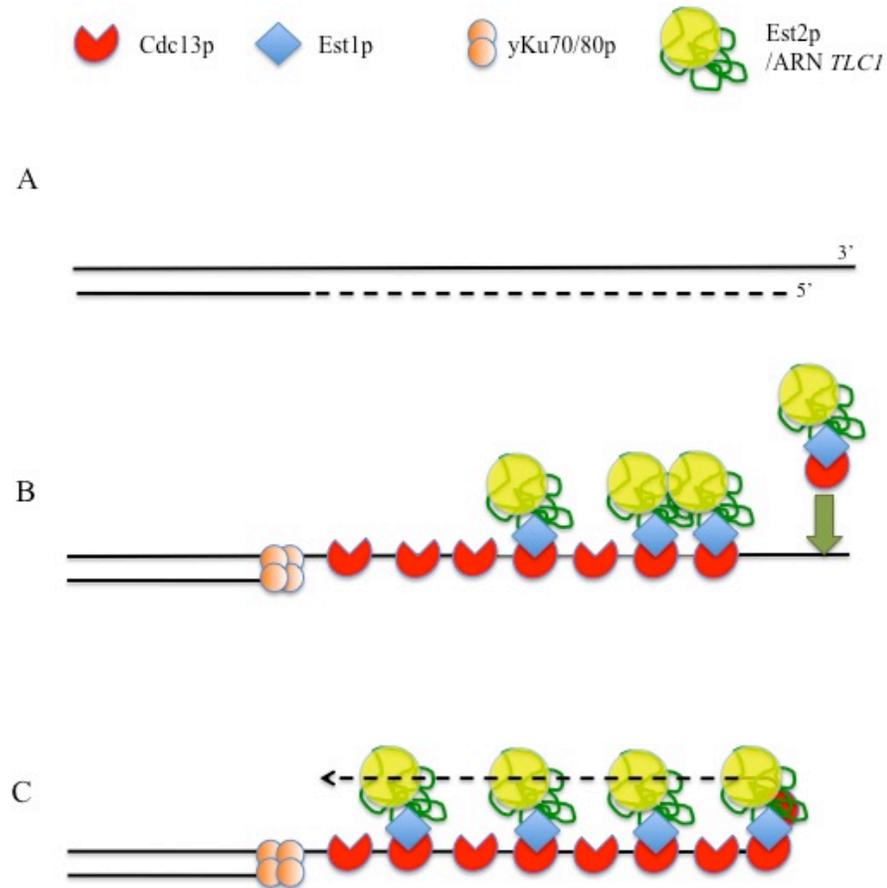
Dans ses essais de STEX, le laboratoire du Dr Lingner avait remarqué, comme mentionné précédemment, que plusieurs enzymes sont capables de participer à l'élongation d'un seul télomère. En condition sauvage, la moyenne d'élongation d'un télomère considéré comme normal (contrairement à court) est de 44nt. Cependant, dans cette étude, ils avaient également remarqué qu'un télomère court, en absence de régulation négative de la télomérase ( $\Delta RIF1$ ) pouvait gagner 500nt en un seul événement de réplication, ce qui est énorme (Teixeira et al, 2004).

*Comment une enzyme non processive peut-elle allonger autant un télomère en un seul cycle de réplication ?*

Nos résultats de l'étude de la localisation de l'ARN *TLC1* dans les cellules vivantes en fin de phase S montre un enrichissement de 6 à 15 fois en télomérase dans les T-rex. Ces T-rex colocalisent avec les regroupements télomériques et leur nombre est altéré en cas de défaut de recrutement de la télomérase aux télomères. Notre étude suggère donc que pour pallier au manque de processivité de la télomérase, sa concentration locale aux télomères en cours de réplication va être augmentée. Cette concentration locale pourrait favoriser les cycles d'échanges de télomérase afin de permettre une élongation consécutive des télomères courts sans la nécessité de facteurs de processivité. Cette nouvelle donnée amène de nouvelles questions, à savoir, quels sont les facteurs qui sont responsables de l'augmentation locale de concentration en télomérase ? Néanmoins, un modèle peut être proposé (Fig. 72).

Contrairement aux télomérase humaines et de *Tetrahymena*, la télomérase de levure n'est pas processive, à l'exception de celle de *Saccharomyces castelli* (Cohn & Blackburn, 1995). Des études de comparaison de séquences entre *S.castelli* et *S.cerevisiae* permettraient

de comprendre quelles régions seraient impliquées dans la processivité de la télomérase (si cette détermination est réalisée par l'ARN). Également, des délétions séquentielles des tiges boucles de fonction inconnue dans l'ARN *TLC1* suivi de sa localisation *in vivo* permettrait de déterminer quelles régions de cet ARN sont impliquées dans la formation des T-répeats.

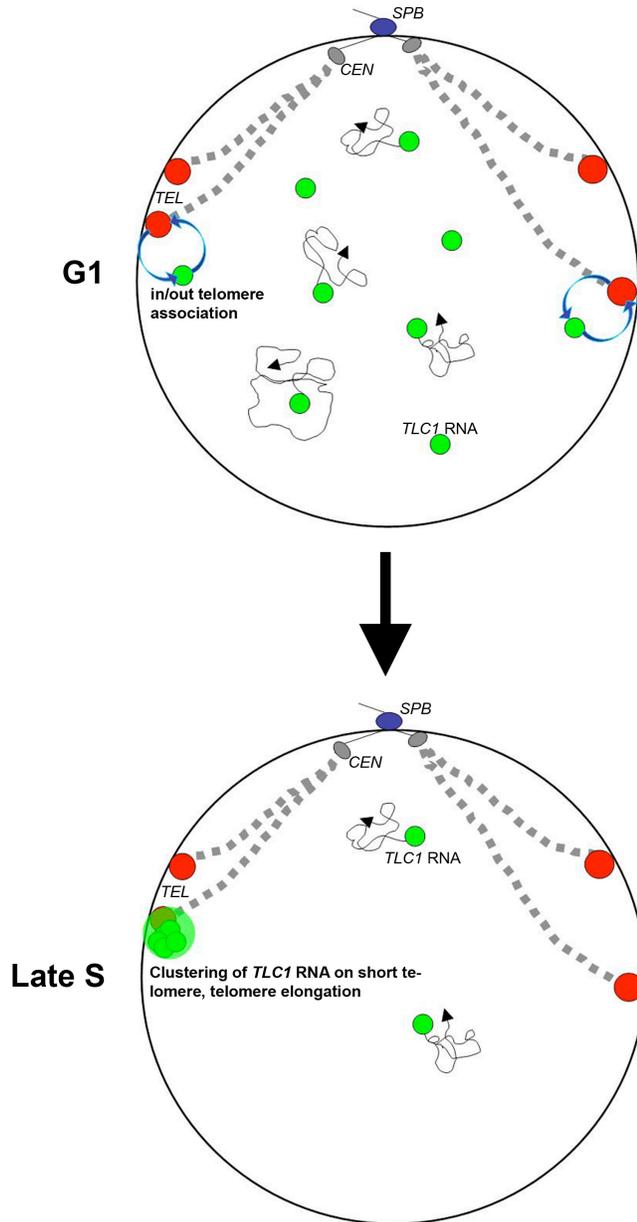


**Figure 72 : Modèle proposé pour le recrutement de la télomérase aux télomères *in vivo*.**

A) La résection du brin riche en C produit des sites de liaison additionnels pour la protéine Cdc13p B) en fin de phase S, la concentration en Est1p augmente et Est1p s'associe avec les complexes Est2p-TLC1. Est1p lie Cdc13p et le complexe entier est recruté aux télomères. C) La concentration locale en télomérase favoriserait l'élongation des télomères (flèche pointillée).

Il sera extrêmement intéressant, voir primordial, de regarder si *hTR* est également capable de former des T-rex dans les cellules humaines cancéreuses. Nous savons qu'il existe une augmentation de l'association de *hTR* avec les télomères dans les cellules cancéreuses (Tomlinson et al, 2006). La présence de un ou plusieurs T-rex pourrait être utilisé comme marqueur de l'activité télomérase. Si un tel marqueur existe, il pourrait être utile pour vérifier l'impact de composés chimiques sur l'accumulation des T-rex par criblage pharmacologique à grande échelle. La découverte de molécules inhibant la formation de T-rex serait un atout pour la lutte contre le cancer.

En intégrant nos résultats de la localisation *in vivo* de *TLCI*, nous avons pu proposer un modèle de la localisation de cet ARN dans les cellules vivantes au cours du cycle cellulaire (principalement de la transition G1 vers S) (Fig. 73).



**Figure 73 : modèle de l'interaction télomère/téломérase au cours des phases G1 et S tardive du cycle cellulaire.**

La position du *Spindle Pole Body*, des centromères et des télomères est indiquée. En G1 et G2, l'ARN *TLC1* a un modèle d'interaction *In/Out*. En phase S tardive, une augmentation

de la concentration locale de l'ARN *TLCI* sur le télomère en cours de réplication forme un T-rex *in vivo*.

Ce modèle suggère que la télomérase n'est pas associée de façon stable aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire. Dans cette phase, l'ARN *TLCI* diffuse librement et même s'il peut interagir avec le télomère, il ne sera pas ancré à celui-ci. Il adopte donc un comportement *In/Out*.

En fin de phase S cependant, l'ARN *TLCI* se regroupe sous forme de T-rex qui colocalisent avec les télomères. La proportion de T-rex est modifiée en cas de défaut de recrutement ou de régulation négative de la télomérase. Nous avons également identifié que la délétion de facteurs impliqués dans la régulation négative de la télomérase empêche la formation de T-rex de manière régulée en fonction des phases du cycle cellulaire. Il sera intéressant de déterminer si cette délétion augmente le taux de formation ou empêche la désagrégation des T-rex en utilisant une forme inductible de notre construction.

Comme nous l'avons vu dans cette discussion, les localisations de l'ARN *TLCI* *in situ* et *in vivo* sont fondamentalement différentes. Certains de nos résultats préliminaires suggèrent que les techniques de fixation employées dans le *FISH* ou le CHIP pourraient expliquer ces différences. Néanmoins, ces expériences ne sont que préliminaires et donc l'interprétation reste purement spéculative. Lors de la fixation des cellules par la paraformaldéhyde, l'agent fixateur va diffuser rapidement dans les cellules. On peut alors considérer que c'est la réaction de fixation elle-même qui va être limitante. Si on considère une enzyme diffusible libre, cette enzyme va avoir une tendance intrinsèque à contacter en priorité son substrat et sera donc plus favorablement enrichie sur celui-ci lors de l'étape de fixation. Cette limite de la technique pourrait expliquer pourquoi l'ARN *TLCI* colocalise aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire en *FISH* mais pas en cellules vivantes. Pour répondre à cette question, nous sommes en train de réaliser des expériences de fixation des

cellules *in vivo* directement sous le microscope afin de visualiser directement l'effet de la paraformaldéhyde sur la localisation de la télomérase aux télomères.

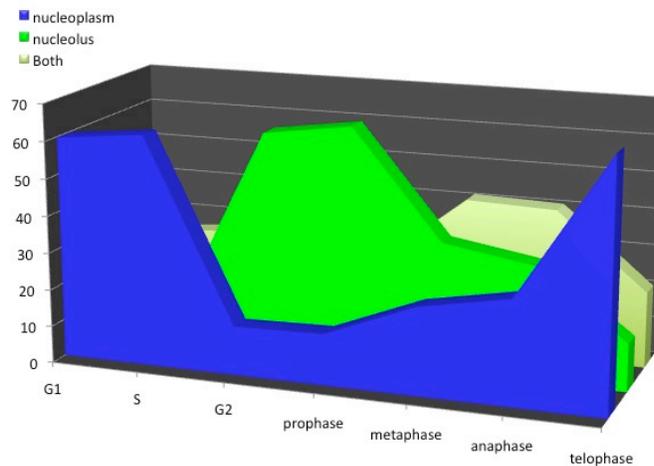
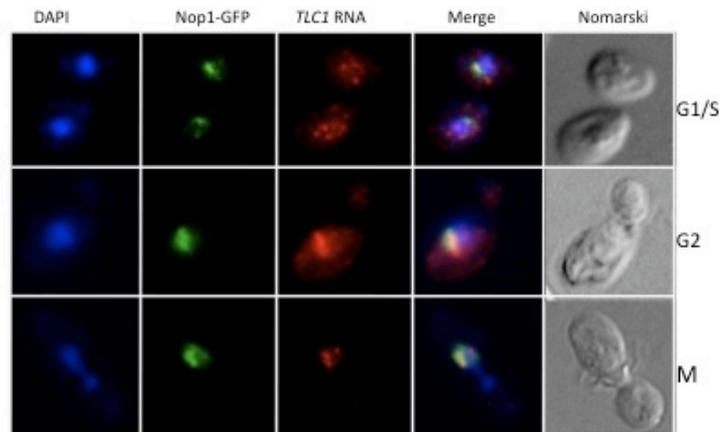
## **PERSPECTIVES**

Dans ce travail, j'ai présenté uniquement les résultats qui ont abouti à la publication d'un article mais différents projets sont encore en cours d'étude et s'avèrent prometteurs.

## **1. La localisation de l'ARN *TLC1* est régulée en fonction du cycle cellulaire.**

Nous avons vu dans la partie introduction que la localisation de l'ARN de la télomérase humaine est régulée en fonction du cycle cellulaire. Ce trafic démontre un échange complexe entre le nucléole, les corps de Cajal et les télomères.

Dans le but de vérifier la présence d'un tel trafic chez *S.cerevisiae*, nous avons réalisé une synchronisation cellulaire et détecté la localisation de l'ARN *TLC1* en fonction des phases du cycle par *FISH* (Fig. 74).



**Figure 74 : étude de la localisation de l'ARN *TLC1* par *FISH* au cours du cycle cellulaire.**

En haut, les cellules ont été synchronisées en phase G1 par le facteur- $\alpha$  puis relâchées. Des aliquots ont été fixés toutes les 15 min et la synchronie a été vérifiée par FACS (non-montré). En bas, 100 cellules pour chaque phase du cycle cellulaire ont été comptées, le résultat est exprimé en %.

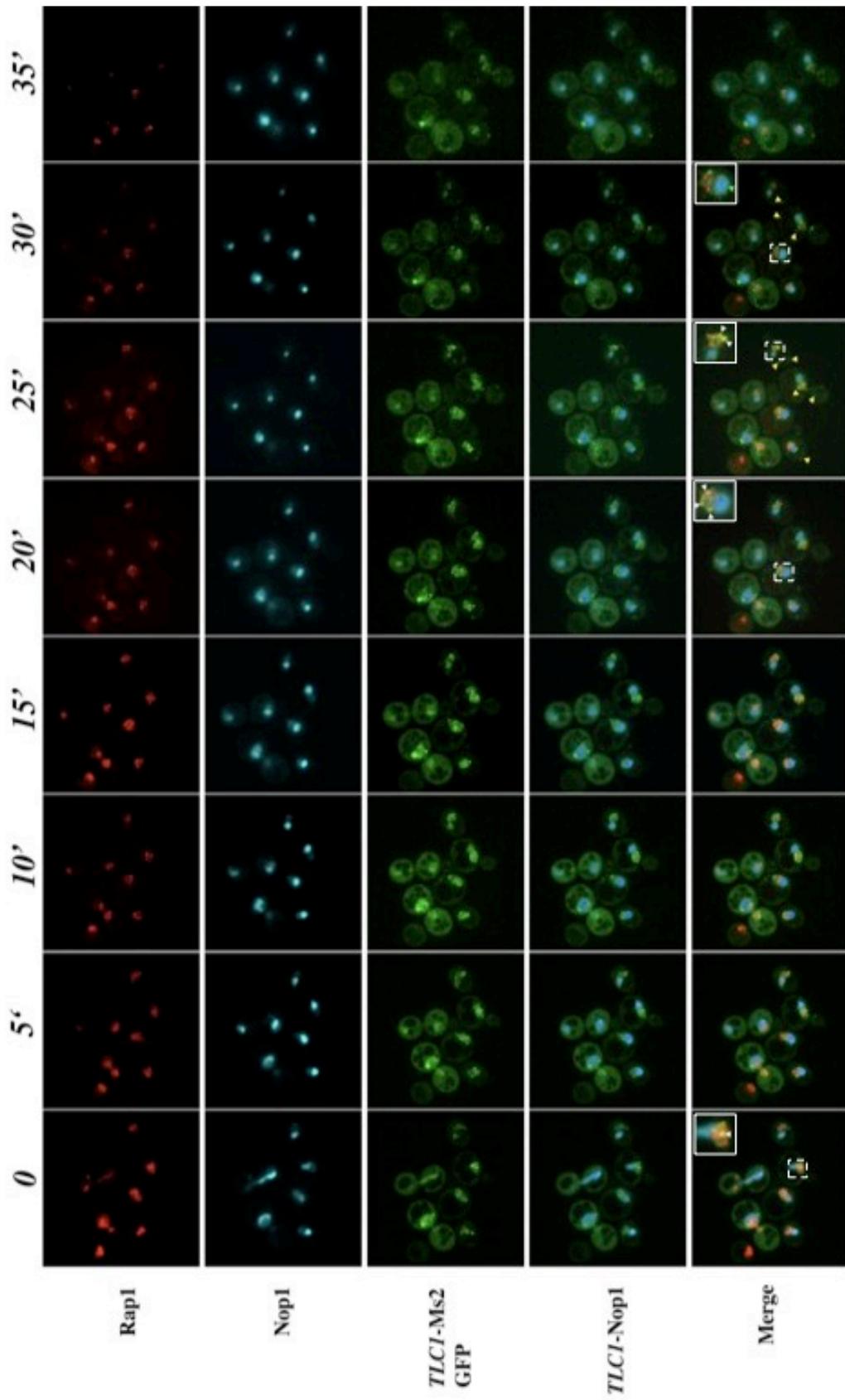
Les résultats montrent que l'ARN *TLC1* est localisé dans le nucléoplasme en phase G1 et S du cycle cellulaire comme décrit précédemment. Nous avons montré que, au cours

de ces phases, l'ARN *TLC1* est associé aux télomères. Cependant, en phase G2 et pendant toute la durée de la mitose, l'ARN *TLC1* est relocalisé dans le nucléole des cellules. Cette relocalisation nucléolaire est dépendante de l'action de la protéine Pif1p, un régulateur négatif de l'activité télomérase (Boule et al, 2005). Ce résultat démontre donc la présence d'un trafic intranucléaire pour l'ARN de la télomérase chez la levure, mais une question se pose : *Quelle est la fonction biologique de ce trafic intranucléaire?*

Une des réponses serait que les cellules ancrent la télomérase dans le nucléole lors de la mitose afin de répartir les stocks de télomérase active entre les cellules mères et filles. Néanmoins, même une enzyme libre dans le noyau serait répartie lors de la mitose. Nos résultats préliminaires montrent que cette localisation est un mécanisme de maintenance de la stabilité génétique qui inhibe le recrutement de la télomérase sur des cassures double brin en G2, évitant ainsi la compétition entre l'ajout de télomères sur les cassures double brin et la recombinaison homologe. Cette hypothèse a été appuyée par les résultats d'une autre équipe très récemment (Makovets & Blackburn, 2009). Nous avons également montré que le trafic intranucléaire de la télomérase est contrôlé par des facteurs protéiques et par des modifications post traductionnelles de différentes natures (méthylation, phosphorylation). Ce projet est encore en cours de développement au laboratoire.

## **2. Existe-t-il un trafic intranucléaire dans les cellules vivantes ?**

Afin de répondre à cette question, nous avons réalisée une technique d'imagerie multi-couleurs en prenant des acquisitions toute les 5 minutes. Nous avons imagé à la fois la position de l'ARN *TLC1*, des télomères, et du nucléole (Fig. 75).



**Figure 75 : localisation de l'ARN de la télomérase, des télomères et du nucléole dans différentes phases du cycle cellulaire de cellules vivantes.**

Une acquisition multicolore à intervalle de temps fixe a été réalisée toutes les 5 min. Les positions de l'ARN *TLC1* (vert), des télomères (Rap1-mCherry : rouge) et du nucléole (Nop1-CFP : bleu) sont montrées. Les boîtes en pointillé dans la partie *merge* montrent la région grossie (en haut à gauche des images). Les pointes de flèches correspondent aux T-rex (blanc), à une accumulation nucléolaire de l'ARN *TLC1* (bleu), et à une localisation cytoplasmique de l'ARN *TLC1* (jaune).

Les résultats suggèrent qu'il existe bien une phase nucléolaire pour l'ARN de la télomérase en cellule vivantes mais nous avons également pu visualiser un autre phénomène.

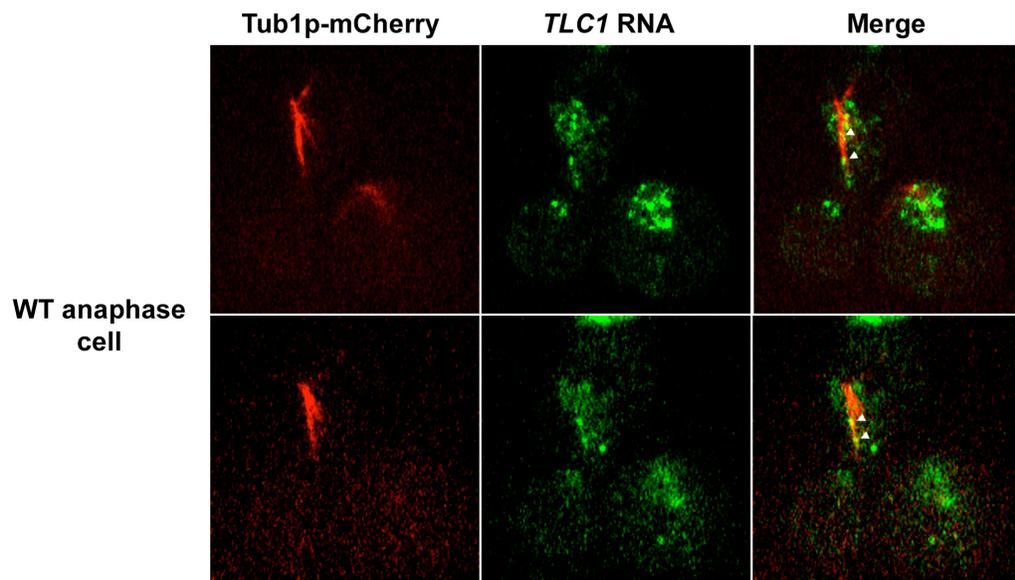
En fin de phase S, nous avons pu voir une accumulation cytoplasmique d'ARN *TLC1*, qui n'est pas présente dans les cellules en mitose. Ce pic d'ARN *TLC1* cytoplasmique pourrait correspondre à un sous-ensemble d'ARN en cours de maturation, différent de l'ARN *TLC1* mature, actif en élongation. Ce résultat suggère donc qu'en fin de phase S, en plus de son activité pour l'élongation des télomères, la transcription de *TLC1* et sa maturation est augmentée. Ce processus s'assurerait qu'un nombre suffisant de molécule est réparti entre les cellules mères et filles lors de la mitose.

### **3. Vers une répartition active des stocks d'ARN *TLC1* en mitose ?**

Au cours de nos expériences de suivi des particules, nous avons pu remarquer un phénomène très intéressant. En effet, dans les cellules en anaphase, où le noyau s'allonge sous forme d'haltère avant d'être séparé entre les cellules mères et filles, nous avons remarqué un comportement particulier pour l'ARN *TLC1*. Certaines molécules qui sont

dans un mode diffusif (500 nm/s) peuvent atteindre des vitesses supérieures à  $1\mu\text{m/s}$  lorsqu'elles sont échangées entre les deux noyaux (l'ARN *TLC1* transite de façon bidirectionnelle). Ce type de vitesse supérieure à  $1\mu\text{m/s}$  correspond à un type particulier de transport, le transport actif, et nécessite la présence de moteurs moléculaires.

Nous savons également que la ségrégation des chromosomes sera réalisée par l'intervention des microtubules issus du *spindle pole body*. Nous avons donc regardé si l'ARN *TLC1* était capable de s'associer avec les microtubules mitotiques lors de l'anaphase (Fig. 76).



**Figure 76 : localisation de l'ARN *TLC1* et des microtubules lors de l'anaphase dans une cellule sauvage vivante.**

La localisation des microtubules est permise par l'utilisation d'une construction de la tubuline  $\alpha$  (Tub1p) étiquetée mCherry (Diploïde YV221/RWY11 LC). La colocalisation *TLC1*-Tub1p est indiquée par des pointes de flèche.

Nous avons pu remarquer une association entre les particules de l'ARN *TLC1* et les microtubules mitotiques lors de l'anaphase de cellules sauvages. En prenant en compte le fait que certaines particules dépassent la vitesse de  $1\mu\text{m/s}$ , il est possible que des kinésines

ou dynéines soient impliquées dans la ségrégation de l'ARN *TLC1* lors de la mitose. Ce projet est encore en cours de développement au laboratoire.

La synchronisation des cellules et le suivi à des temps courts de la localisation de *TLC1* dans les cellules vivantes seront des atouts précieux pour caractériser sa régulation en fonction du cycle cellulaire. De même, l'implication de moteurs moléculaires impliqués dans le transport de la télomérase serait une découverte majeure dans la compréhension de sa localisation et de sa répartition au cours du cycle cellulaire.

En combinant nos approches d'études *in situ* et *in vivo*, nous avons pu identifier les voies de biosynthèse de l'ARN *TLC1* endogène. Nos résultats sont fondamentalement différents des résultats obtenus par études indirectes sur des cellules fixées, communément admis par la communauté scientifique, qui ne représentent pas le comportement *in vivo* de l'ARN *TLC1*. Ce point est un problème majeur puisque les études *in vitro* ou en condition de surexpression se généralisent et parfois, une surinterprétation est effectuée. Les résultats obtenus *in vitro* ou en surexpression sont trop souvent proposés comme le reflet de ce qu'il se passe *in vivo*, alors que nous avons vu dans ce travail qu'ils peuvent être fondamentalement différents.

La combinaison d'approches *in situ* et *in vivo* au cours de ce projet nous a donné une vue globale des mécanismes impliqués dans la biogènes de la télomérase et a finalement fourni une perspective différente du mécanisme d'homéostasie des télomères.

## Conclusion

Notre étude a donc amené de nouvelles perspectives sur la compréhension du phénomène d'homéostasie des télomères chez la levure *S.cerevisiae*. Elle a également ouvert des pistes qui permettront peut-être de mieux comprendre comment la télomérase humaine est assemblée et régulée. Il sera primordial de déterminer si les facteurs et caractéristiques impliqués dans l'activité de l'ARN *TLC1* chez *S.cerevisiae* sont conservés pour la télomérase humaine.

Nous savons à l'heure actuelle que l'apparition des cancers est un événement multifactoriel. Les facteurs impliqués dans cette apparition sont différents entre types cancéreux et entre individu. Cependant, la maintenance télomérique est une condition *sine qua non* et commune au développement de tous les types cancéreux. En considérant ce point, les thérapies anti tumorales ciblant la télomérase m'apparaissent les plus prometteuses aux jours d'aujourd'hui. Je souhaite fortement que ces thérapies aboutissent un jour à un traitement efficace et je suivrai avec attention ces développements car nous avons ou serons tous confronté un jour à cette maladie dans nos familles respectives. Je pense, comme la plupart de mes collègues, que le cancer représente le fléau de notre temps comme le fut la peste ou le cholera. Maintenant, des traitements existent pour ces maladies et j'espère que, dans les années futures, nous célébrerons tous notre victoire du combat entre la science et le cancer. En attendant ce jour, je patienterai et travaillerai.

Nous savons également que la télomérase est impliquée dans la longévité des organismes et certaines études du laboratoire du Dr Blasco relie directement la télomérase à la longévité des souris (Tomas-Loba et al, 2008). Qui n'a pas rêvé un jour de pouvoir approcher l'immortalité ? Vivre en bonne santé et profiter de la vie sur le long terme. Peut-être que la réponse viendra des études visant la compréhension de la télomérase, une enzyme qui apparaît comme la nouvelle fontaine de jouvence. Toutefois, des précautions éthiques sont à prendre quant à l'allongement artificiel de la durée de vie des organismes, notamment quand on regarde les problèmes démographiques actuels. Notre planète voit ses ressources s'amenuiser et la surpopulation entraînée par de tels développements pourrait

avoir des conséquences négatives sur la pérennité de l'espèce. En tant que levuriste, une comparaison évidente me vient à l'esprit, où nous sommes tous des levures essayant de prendre notre place sur une boîte de pétri qui contient des ressources limitées. Les études de longévité impliquant la télomérase devront donc être encadrée par des études éthiques rigoureuses et parcimonieuses.

## Bibliographie

- Alberts B (2003) DNA replication and recombination. *Nature* **421**(6921): 431-435
- Amberg DC, Goldstein AL, Cole CN (1992) Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* **6**(7): 1173-1189
- Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, Angelov D, Hug N, Vindigni A, Bouvet P, Paoletti J, Gilson E, Giraud-Panis MJ (2007) A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 147-154
- Autexier C, Lue NF (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem* **75**: 493-517
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**(5851): 798-801
- Bae NS, Baumann P (2007) A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Mol Cell* **26**(3): 323-334
- Banik SS, Counter CM (2004) Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *J Biol Chem* **279**(50): 51745-51748
- Bao G, Rhee WJ, Tsourkas A (2009) Fluorescent probes for live-cell RNA detection. *Annu Rev Biomed Eng* **11**: 25-47
- Bardwell VJ, Wickens M (1990) Purification of RNA and RNA-protein complexes by an R17 coat protein affinity method. *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6587-6594
- Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**(5519): 1171-1175
- Benetti R, Schoeftner S, Munoz P, Blasco MA (2008) Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. *Cell Cycle* **7**(21): 3461-3468
- Berman J, Tachibana CY, Tye BK (1986) Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 3713-3717
- Bernardi A, Spahr PF (1972) Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(10): 3033-3037
- Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM (1998) Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**(4): 437-445

- Bertuch AA, Lundblad V (2003) The Ku heterodimer performs separable activities at double-strand breaks and chromosome termini. *Mol Cell Biol* **23**(22): 8202-8215
- Bertuch AA, Lundblad V (2004) EXO1 contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **166**(4): 1651-1659
- Bessman MJ, Kornberg A, Lehman IR, Simms ES (1956) Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* **21**(1): 197-198
- Bianchi A, Shore D (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell* **31**(2): 153-165
- Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* **16**(7): 1785-1794
- Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**(2): 236-239
- Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* **120**(1): 33-53
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**(5349): 349-352
- Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP (2009) Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Mol Cell* **35**(1): 70-81
- Boule JB, Vega LR, Zakian VA (2005) The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* **438**(7064): 57-61
- Boulon S, Verheggen C, Jady BE, Girard C, Pescia C, Paul C, Ospina JK, Kiss T, Matera AG, Bordonne R, Bertrand E (2004) PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell* **16**(5): 777-787
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**(23): 2888-2902

- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**(2): 231-235
- Buchman AR, Kimmerly WJ, Rine J, Kornberg RD (1988) Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**(1): 210-225
- Buck SW, Shore D (1995) Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev* **9**(3): 370-384
- Budd ME, Reis CC, Smith S, Myung K, Campbell JL (2006) Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol Cell Biol* **26**(7): 2490-2500
- Burgers PM (2009) Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem* **284**(7): 4041-4045
- Bystricky K, Laroche T, van Houwe G, Blaszczyk M, Gasser SM (2005) Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *J Cell Biol* **168**(3): 375-387
- Cacchione S, Cerone MA, Savino M (1997) In vitro low propensity to form nucleosomes of four telomeric sequences. *FEBS Lett* **400**(1): 37-41
- Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, Rowson J, Letsolo B, Man S, Haughton M, Baird DM (2007) The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* **21**(19): 2495-2508
- Celli GB, de Lange T (2005) DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* **7**(7): 712-718
- Celli GB, Denchi EL, de Lange T (2006) Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* **8**(8): 885-890
- Cerone MA, Ward RJ, Londono-Vallejo JA, Autexier C (2005) Telomerase RNA mutated in autosomal dyskeratosis congenita reconstitutes a weakly active telomerase enzyme defective in telomere elongation. *Cell Cycle* **4**(4): 585-589
- Chan A, Boule JB, Zakian VA (2008) Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet* **4**(10): e1000236

- Chan SW, Blackburn EH (2003) Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell* **11**(5): 1379-1387
- Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**(4): 404-414
- Chang M, Arneric M, Lingner J (2007) Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **21**(19): 2485-2494
- Chang S, Multani AS, Cabrera NG, Naylor ML, Laud P, Lombard D, Pathak S, Guarente L, DePinho RA (2004) Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet* **36**(8): 877-882
- Chapon C, Cech TR, Zaug AJ (1997) Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* **3**(11): 1337-1351
- Chartrand P, Bertrand E, Singer RH, Long RM (2000) Sensitive and high-resolution detection of RNA in situ. *Methods Enzymol* **318**: 493-506
- Chen JL, Greider CW (2004) Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci* **29**(4): 183-192
- Chen JL, Opperman KK, Greider CW (2002) A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Res* **30**(2): 592-597
- Chikashige Y, Hiraoka Y (2001) Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol* **11**(20): 1618-1623
- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T (1995) A human telomeric protein. *Science* **270**(5242): 1663-1667
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**(5820): 1850-1853
- Cohn M, Blackburn EH (1995) Telomerase in yeast. *Science* **269**(5222): 396-400
- Conde J, Fink GR (1976) A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(10): 3651-3655

- Cong YS, Wright WE, Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(3): 407-425, table of contents
- Conrad MN, Wright JH, Wolf AJ, Zakian VA (1990) RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**(4): 739-750
- Cosgrove AJ, Nieduszynski CA, Donaldson AD (2002) Ku complex controls the replication time of DNA in telomere regions. *Genes Dev* **16**(19): 2485-2490
- Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J (2004) Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* **306**(5703): 1951-1953
- Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, Lingner J (2007) Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* **27**(6): 882-889
- Cristofari G, Lingner J (2006) Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *EMBO J* **25**(3): 565-574
- Dahlseid JN, Lew-Smith J, Lelivelt MJ, Enomoto S, Ford A, Desruisseaux M, McClellan M, Lue N, Culbertson MR, Berman J (2003) mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2**(1): 134-142
- Dandjinou AT, Levesque N, Larose S, Lucier JF, Abou Elela S, Wellinger RJ (2004) A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* **14**(13): 1148-1158
- Darzacq X, Jady BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T (2002) Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* **21**(11): 2746-2756
- de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**(18): 2100-2110
- de Lange T (2009) How telomeres solve the end-protection problem. *Science* **326**(5955): 948-952
- Dejardin J, Kingston RE (2009) Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* **136**(1): 175-186

- Denchi EL, de Lange T (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**(7157): 1068-1071
- Deng Z, Dheekollu J, Broccoli D, Dutta A, Lieberman PM (2007) The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. *Curr Biol* **17**(22): 1989-1995
- Deng Z, Lezina L, Chen CJ, Shtivelband S, So W, Lieberman PM (2002) Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Mol Cell* **9**(3): 493-503
- Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM (2009) TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* **35**(4): 403-413
- DeZwaan DC, Freeman BC (2009) The conserved Est1 protein stimulates telomerase DNA extension activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(41): 17337-17342
- Diede SJ, Gottschling DE (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**(7): 723-733
- Diede SJ, Gottschling DE (2001) Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr Biol* **11**(17): 1336-1340
- Dionne I, Wellinger RJ (1996) Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13902-13907
- Dionne I, Wellinger RJ (1998) Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5365-5371
- DuBois ML, Haimberger ZW, McIntosh MW, Gottschling DE (2002) A quantitative assay for telomere protection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **161**(3): 995-1013
- Ebrahimi H, Donaldson AD (2008) Release of yeast telomeres from the nuclear periphery is triggered by replication and maintained by suppression of Ku-mediated anchoring. *Genes Dev* **22**(23): 3363-3374
- Errington TM, Fu D, Wong JM, Collins K (2008) Disease-associated human telomerase RNA variants show loss of function for telomere synthesis without dominant-negative interference. *Mol Cell Biol* **28**(20): 6510-6520

- Feeser EA, Wolberger C (2008) Structural and functional studies of the Rap1 C-terminus reveal novel separation-of-function mutants. *J Mol Biol* **380**(3): 520-531
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**(1): 6-13
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* **269**(5228): 1236-1241
- Ferguson BM, Fangman WL (1992) A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* **68**(2): 333-339
- Ferrezuelo F, Steiner B, Aldea M, Futcher B (2002) Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Mol Cell Biol* **22**(17): 6046-6055
- Fisher TS, Taggart AK, Zakian VA (2004) Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1198-1205
- Forsburg SL (2008) The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 1): 114-119
- Frank CJ, Hyde M, Greider CW (2006) Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol Cell* **24**(3): 423-432
- Franke J, Gehlen J, Ehrenhofer-Murray AE (2008) Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase Tgs1. *J Cell Sci* **121**(Pt 21): 3553-3560
- Friedman KL, Cech TR (1999) Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev* **13**(21): 2863-2874
- Friedman KL, Heit JJ, Long DM, Cech TR (2003) N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Mol Biol Cell* **14**(1): 1-13
- Funayama R, Ishikawa F (2007) Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* **116**(5): 431-440

- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* **13**(2): 161-167
- Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E (2001) Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* **21**(10): 3405-3415
- Gallardo F, Chartrand P (2008) Telomerase biogenesis: The long road before getting to the end. *RNA Biol* **5**(4): 212-215
- Gallardo F, Chartrand P (2009) [Telomerase biogenesis: a journey to the end of chromosomes]. *Med Sci (Paris)* **25**(3): 232-233
- Gallardo F, Olivier C, Dandjinou AT, Wellinger RJ, Chartrand P (2008) TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J* **27**(5): 748-757
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* **36**(1): 94-99
- Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6128-6138
- Gell D, Jackson SP (1999) Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res* **27**(17): 3494-3502
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96
- Gilson E, Geli V (2007) How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 825-838
- Gilson E, Roberge M, Giraldo R, Rhodes D, Gasser SM (1993) Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol* **231**(2): 293-310
- Gleizes PE, Noaillac-Depeyre J, Leger-Silvestre I, Teulieres F, Dauxois JY, Pommet D, Azum-Gelade MC, Gas N (2001) Ultrastructural localization of rRNA shows defective

- nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* **155**(6): 923-936
- Good L, Intine RV, Nazar RN (1997) Interdependence in the processing of ribosomal RNAs in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **273**(4): 782-788
- Gorlich D, Mattaj IW (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**(5255): 1513-1518
- Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM (1996) The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**(6): 1349-1363
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**(4): 751-762
- Grandin N, Reed SI, Charbonneau M (1997) Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**(4): 512-527
- Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, Wellinger RJ (1998) Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**(5364): 741-744
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-413
- Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**(6): 887-898
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205): 331-337
- Griffith J, Bianchi A, de Lange T (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol* **278**(1): 79-88
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-514
- Gunisova S, Elboher E, Nosek J, Gorkovoy V, Brown Y, Lucier JF, Laterreur N, Wellinger RJ, Tzfati Y, Tomaska L (2009) Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. *RNA* **15**(4): 546-559

- Hanaoka S, Nagadoi A, Yoshimura S, Aimoto S, Li B, de Lange T, Nishimura Y (2001) NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J Mol Biol* **312**(1): 167-175
- Hanna M, Xiao W (2006) Isolation of nucleic acids. *Methods Mol Biol* **313**: 15-20
- Hardy CF, Balderes D, Shore D (1992a) Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein RAP1 with effects on both transcriptional activation and silencing. *Mol Cell Biol* **12**(3): 1209-1217
- Hardy CF, Sussel L, Shore D (1992b) A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6**(5): 801-814
- Harley CB (2008) Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **8**(3): 167-179
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621
- Hecht A, Strahl-Bolsinger S, Grunstein M (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**(6595): 92-96
- Hediger F, Neumann FR, Van Houwe G, Dubrana K, Gasser SM (2002) Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol* **12**(24): 2076-2089
- Hediger F, Taddei A, Neumann FR, Gasser SM (2004) Methods for visualizing chromatin dynamics in living yeast. *Methods Enzymol* **375**: 345-365
- Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I (1998) X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* **19**(1): 32-38
- Henry YA, Chambers A, Tsang JS, Kingsman AJ, Kingsman SM (1990) Characterisation of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Res* **18**(9): 2617-2623
- Ho CY, Murnane JP, Yeung AK, Ng HK, Lo AW (2008) Telomeres acquire distinct heterochromatin characteristics during siRNA-induced RNA interference in mouse cells. *Curr Biol* **18**(3): 183-187

- Hockemeyer D, Daniels JP, Takai H, de Lange T (2006) Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* **126**(1): 63-77
- Hockemeyer D, Palm W, Else T, Daniels JP, Takai KK, Ye JZ, Keegan CE, de Lange T, Hammer GD (2007) Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat Struct Mol Biol* **14**(8): 754-761
- Hopper AK (2006) Cellular dynamics of small RNAs. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(1): 3-19
- Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12454-12458
- Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, Kim SH, Li GC, Campisi J, Kohwi-Shigematsu T, Chen DJ (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* **14**(22): 2807-2812
- Hsu M, Yu EY, Singh SM, Lue NF (2007) Mutual dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation. *Eukaryot Cell* **6**(8): 1330-1338
- Huet J, Cottrelle P, Cool M, Vignais ML, Thiele D, Marck C, Buhler JM, Sentenac A, Fromageot P (1985) A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *EMBO J* **4**(13A): 3539-3547
- Hughes TR, Evans SK, Weilbaecher RG, Lundblad V (2000) The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* **10**(13): 809-812
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**(6771): 795-800
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**(7011): 1011-1017
- Ivessa AS, Zhou JQ, Schulz VP, Monson EK, Zakian VA (2002) *Saccharomyces* Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev* **16**(11): 1383-1396

- Ivessa AS, Zhou JQ, Zakian VA (2000) The *Saccharomyces* Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA. *Cell* **100**(4): 479-489
- Izaurrealde E, Kutay U, von Kobbe C, Mattaj IW, Gorlich D (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J* **16**(21): 6535-6547
- Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T (2006) Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* **17**(2): 944-954
- Janknecht R (2004) On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* **564**(1-2): 9-13
- Jeong HS, Backlund PS, Chen HC, Karavanov AA, Crouch RJ (2004) RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins. *Nucleic Acids Res* **32**(2): 407-414
- Kanoh J, Ishikawa F (2001) spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol* **11**(20): 1624-1630
- Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol* **145**(6): 1145-1152
- Keryer-Bibens C, Barreau C, Osborne HB (2008) Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. *Biol Cell* **100**(2): 125-138
- Kim JH, Park SM, Kang MR, Oh SY, Lee TH, Muller MT, Chung IK (2005) Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev* **19**(7): 776-781
- Kim M, Krogan NJ, Vasiljeva L, Rando OJ, Nedeja E, Greenblatt JF, Buratowski S (2004) The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* **432**(7016): 517-522
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**(4): 405-412
- Kipling D, Cooke HJ (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**(6291): 400-402

- Kiss AM, Jady BE, Darzacq X, Verheggen C, Bertrand E, Kiss T (2002) A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res* **30**(21): 4643-4649
- Klein F, Laroche T, Cardenas ME, Hofmann JF, Schweizer D, Gasser SM (1992) Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol* **117**(5): 935-948
- Kohler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 761-773
- Kornberg A (1977) Multiple stages in the enzymic replication of DNA. *Biochem Soc Trans* **5**(2): 359-374
- Kyrion G, Boakye KA, Lustig AJ (1992) C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**(11): 5159-5173
- Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, Gasser SM (1998) Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**(11): 653-656
- Larrivee M, LeBel C, Wellinger RJ (2004) The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**(12): 1391-1396
- Larson DR, Singer RH, Zenklusen D (2009) A single molecule view of gene expression. *Trends Cell Biol* **19**(11): 630-637
- Lee H, Sengupta N, Villagra A, Rezai-Zadeh N, Seto E (2006) Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5259-5269
- Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE (1998) *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**(3): 399-409
- Leger-Silvestre I, Milkereit P, Ferreira-Cerca S, Saveanu C, Rousselle JC, Choismel V, Guinefoleau C, Gas N, Gleizes PE (2004) The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J* **23**(12): 2336-2347

- Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E (2006) The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* **16**(13): 1303-1310
- Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**(4): 1399-1412
- Levy DL, Blackburn EH (2004) Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol Cell Biol* **24**(24): 10857-10867
- Li B, de Lange T (2003) Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* **14**(12): 5060-5068
- Li B, Oestreich S, de Lange T (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**(5): 471-483
- Li S, Makovets S, Matsuguchi T, Blethrow JD, Shokat KM, Blackburn EH (2009) Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression. *Cell* **136**(1): 50-61
- Liew LP, Norbury CJ (2009) Telomere maintenance: all's well that ends well. *Arch Toxicol* **83**(5): 407-416
- Lim F, Peabody DS (1994) Mutations that increase the affinity of a translational repressor for RNA. *Nucleic Acids Res* **22**(18): 3748-3752
- Lin J, Blackburn EH (2004) Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes Dev* **18**(4): 387-396
- Lin SY, Elledge SJ (2003) Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* **113**(7): 881-889
- Lingner J, Cech TR, Hughes TR, Lundblad V (1997) Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11190-11195
- Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegerler A, Qin J, Songyang Z (2004) POT1 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**(7): 673-680

- Livengood AJ, Zaugg AJ, Cech TR (2002) Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2366-2374
- Louis EJ, Haber JE (1990a) Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**(3): 547-559
- Louis EJ, Haber JE (1990b) The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* **124**(3): 533-545
- Louis EJ, Haber JE (1992) The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**(3): 559-574
- Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J (2008) The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **32**(4): 465-477
- Lukowiak AA, Narayanan A, Li ZH, Terns RM, Terns MP (2001) The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* **7**(12): 1833-1844
- Lundblad V (2006) Telomeres in the '80s: a few recollections. *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1036-1038
- Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**(4): 633-643
- Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**(5): 657-666
- Makovets S, Blackburn EH (2009) DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol* **11**(11): 1383-1386
- Malik HS, Burke WD, Eickbush TH (2000) Putative telomerase catalytic subunits from *Giardia lamblia* and *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **251**(2): 101-108
- Marcand S, Brevet V, Gilson E (1999) Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J* **18**(12): 3509-3519

- Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E (2000) Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* **10**(8): 487-490
- Marcand S, Gilson E, Shore D (1997) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**(5302): 986-990
- Martin-Rivera L, Blasco MA (2001) Identification of functional domains and dominant negative mutations in vertebrate telomerase RNA using an in vivo reconstitution system. *J Biol Chem* **276**(8): 5856-5865
- Martinez P, Thanasoula M, Munoz P, Liao C, Tejera A, McNees C, Flores JM, Fernandez-Capetillo O, Tarsounas M, Blasco MA (2009) Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev* **23**(17): 2060-2075
- McClintock B (1929) Chromosome Morphology in Zea Mays. *Science* **69**(1798): 629
- McClintock B (1932) A Correlation of Ring-Shaped Chromosomes with Variegation in Zea Mays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**(12): 677-681
- McClintock B (1938) The Production of Homozygous Deficient Tissues with Mutant Characteristics by Means of the Aberrant Mitotic Behavior of Ring-Shaped Chromosomes. *Genetics* **23**(4): 315-376
- McClintock B (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**(2): 234-282
- McMacken R, Ueda K, Kornberg A (1977) Migration of Escherichia coli dnaB protein on the template DNA strand as a mechanism in initiating DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4190-4194
- Meier UT, Blobel G (1994) NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol* **127**(6 Pt 1): 1505-1514
- Meselson M, Stahl FW (1958) The Replication of DNA in Escherichia Coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(7): 671-682
- Mieczkowski PA, Mieczkowska JO, Dominska M, Petes TD (2003) Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10854-10859

- Miller KM, Rog O, Cooper JP (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* **440**(7085): 824-828
- Mitchell JR, Cheng J, Collins K (1999a) A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* **19**(1): 567-576
- Mitchell JR, Collins K (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* **6**(2): 361-371
- Mitchell JR, Wood E, Collins K (1999b) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**(6761): 551-555
- Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, Ishikawa F (2009) RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell* **36**(2): 193-206
- Moon IK, Jarstfer MB (2007) The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering. *Front Biosci* **12**: 4595-4620
- Moore MS, Blobel G (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**(6447): 661-663
- Moretti P, Freeman K, Coodly L, Shore D (1994) Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**(19): 2257-2269
- Moy TI, Silver PA (1999) Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* **13**(16): 2118-2133
- Mozdy AD, Cech TR (2006) Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* **12**(9): 1721-1737
- Mozdy AD, Podell ER, Cech TR (2008) Multiple yeast genes, including Paf1 complex genes, affect telomere length via telomerase RNA abundance. *Mol Cell Biol* **28**(12): 4152-4161
- Muller HJ (1928) The Production of Mutations by X-Rays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **14**(9): 714-726

- Negrini S, Ribaud V, Bianchi A, Shore D (2007) DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes Dev* **21**(3): 292-302
- Neville M, Rosbash M (1999) The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **18**(13): 3746-3756
- Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A (2007) Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* **8**(1): 34-39
- Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F (2001) In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol* **21**(17): 5753-5766
- Olovnikov AM (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* **31**(4): 443-448
- Olson BL, Siliciano PG (2003) A diverse set of nuclear RNAs transfer between nuclei of yeast heterokaryons. *Yeast* **20**(10): 893-903
- Opresko PL, Otterlei M, Graakjaer J, Bruheim P, Dawut L, Kolvraa S, May A, Seidman MM, Bohr VA (2004) The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **14**(6): 763-774
- Osterhage JL, Talley JM, Friedman KL (2006) Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* **13**(8): 720-728
- Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* **75**(3): 543-555
- Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* **42**: 301-334
- Palm W, Hockemeyer D, Kibe T, de Lange T (2009) Functional dissection of human and mouse POT1 proteins. *Mol Cell Biol* **29**(2): 471-482
- Pardo B, Marcand S (2005) Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J* **24**(17): 3117-3127
- Pazolli E, Stewart SA (2008) Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 42-47

- Pennock E, Buckley K, Lundblad V (2001) Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**(3): 387-396
- Petfalski E, Dandekar T, Henry Y, Tollervey D (1998) Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Mol Cell Biol* **18**(3): 1181-1189
- Petreaca RC, Chiu HC, Eckelhoefer HA, Chuang C, Xu L, Nugent CI (2006) Chromosome end protection plasticity revealed by Stn1p and Ten1p bypass of Cdc13p. *Nat Cell Biol* **8**(7): 748-755
- Pina B, Fernandez-Larrea J, Garcia-Reyero N, Idrissi FZ (2003) The different (sur)faces of Rap1p. *Mol Genet Genomics* **268**(6): 791-798
- Poloumienko A, Dershowitz A, De J, Newlon CS (2001) Completion of replication map of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III. *Mol Biol Cell* **12**(11): 3317-3327
- Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, Petes TD (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**(4): 582-585
- Puglisi A, Bianchi A, Lemmens L, Damay P, Shore D (2008) Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J*
- Qi H, Zakian VA (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev* **14**(14): 1777-1788
- Qian W, Wang J, Jin NN, Fu XH, Lin YC, Lin JJ, Zhou JQ (2009) Ten1p promotes the telomeric DNA-binding activity of Cdc13p: implication for its function in telomere length regulation. *Cell Res* **19**(7): 849-863
- Qiu J, Qian Y, Frank P, Wintersberger U, Shen B (1999) *Saccharomyces cerevisiae* RNase H(35) functions in RNA primer removal during lagging-strand DNA synthesis, most efficiently in cooperation with Rad27 nuclease. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8361-8371
- Querido E, Chartrand P (2008) Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol* **85**: 273-292

- Raghuraman MK, Winzeler EA, Collingwood D, Hunt S, Wodicka L, Conway A, Lockhart DJ, Davis RW, Brewer BJ, Fangman WL (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**(5540): 115-121
- Redon S, Reichenbach P, Lingner J (2007) Protein RNA and protein protein interactions mediate association of human EST1A/SMG6 with telomerase. *Nucleic Acids Res* **35**(20): 7011-7022
- Reed R, Hurt E (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**(4): 523-531
- Reichenbach P, Hoss M, Azzalin CM, Nabholz M, Bucher P, Lingner J (2003) A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* **13**(7): 568-574
- Renauld H, Aparicio OM, Zierath PD, Billington BL, Chhablani SK, Gottschling DE (1993) Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev* **7**(7A): 1133-1145
- Rexach M, Blobel G (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**(5): 683-692
- Ribes-Zamora A, Mihalek I, Lichtarge O, Bertuch AA (2007) Distinct faces of the Ku heterodimer mediate DNA repair and telomeric functions. *Nat Struct Mol Biol* **14**(4): 301-307
- Robart AR, Collins K Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. *J Biol Chem* **285**(7): 4375-4386
- Robyr D, Suka Y, Xenarios I, Kurdistani SK, Wang A, Suka N, Grunstein M (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**(4): 437-446
- Rossi ML, Purohit V, Brandt PD, Bambara RA (2006) Lagging strand replication proteins in genome stability and DNA repair. *Chem Rev* **106**(2): 453-473
- Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**(4): 635-651

- Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA (2007) Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **27**(4): 550-561
- Sakabe K, Okazaki R (1966) A unique property of the replicating region of chromosomal DNA. *Biochim Biophys Acta* **129**(3): 651-654
- Sarthy J, Bae NS, Scrafford J, Baumann P (2009) Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J* **28**(21): 3390-3399
- Schmid M, Jensen TH (2008) Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma* **117**(5): 419-429
- Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**(10): 3091-3092
- Schober H, Ferreira H, Kalck V, Gehlen LR, Gasser SM (2009) Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev* **23**(8): 928-938
- Schoeftner S, Blasco MA (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* **10**(2): 228-236
- Schulz VP, Zakian VA (1994) The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**(1): 145-155
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Luhrmann R, Hurt E (1997) Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *EMBO J* **16**(11): 3256-3271
- Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J* **19**(11): 2652-2661
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8496-8501
- Seto AG, Livengood AJ, Tzfati Y, Blackburn EH, Cech TR (2002) A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* **16**(21): 2800-2812
- Seto AG, Zaugg AJ, Sobel SG, Wolin SL, Cech TR (1999) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**(6749): 177-180

Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* **138**(1): 90-103

Shaheen HH, Hopper AK (2005) Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11290-11295

Sharanov YS, Zvereva MI, Dontsova OA (2006) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes. *FEBS Lett* **580**(19): 4683-4690

Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, Fusco D, Janicki SM, Spector DL, Singer RH (2004a) Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* **304**(5678): 1797-1800

Shav-Tal Y, Singer RH, Darzacq X (2004b) Imaging gene expression in single living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 855-861

Shen J, Loeb LA (2001) Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mech Ageing Dev* **122**(9): 921-944

Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168

Shore D, Nasmyth K (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**(5): 721-732

Singer MS, Gottschling DE (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**(5184): 404-409

Smith JS, Boeke JD (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* **11**(2): 241-254

Smogorzewska A, de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208

Snow BE, Erdmann N, Cruickshank J, Goldman H, Gill RM, Robinson MO, Harrington L (2003) Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* **13**(8): 698-704

Stansel RM, de Lange T, Griffith JD (2001) T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J* **20**(19): 5532-5540

- Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2002) Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* **298**(5602): 2390-2392
- Stavenhagen JB, Zakian VA (1998) Yeast telomeres exert a position effect on recombination between internal tracts of yeast telomeric DNA. *Genes Dev* **12**(19): 3044-3058
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* **17**(19): 2384-2395
- Stevenson JB, Gottschling DE (1999) Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev* **13**(2): 146-151
- Strasser K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondon AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**(6886): 304-308
- Sun J, Yu EY, Yang Y, Confer LA, Sun SH, Wan K, Lue NF, Lei M (2009) Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. *Genes Dev* **23**(24): 2900-2914
- Surovtseva YV, Churikov D, Boltz KA, Song X, Lamb JC, Warrington R, Leehy K, Heacock M, Price CM, Shippen DE (2009) Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol Cell* **36**(2): 207-218
- Sussel L, Shore D (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAPI-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7749-7753
- Szostak JW, Blackburn EH (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**(1): 245-255
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, Gasser SM (2004) Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J* **23**(6): 1301-1312
- Taggart AK, Teng SC, Zakian VA (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**(5583): 1023-1026

- Takano A, Endo T, Yoshihisa T (2005) tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* **309**(5731): 140-142
- Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J (2004) Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell* **117**(3): 323-335
- Teixeira MT, Forstemann K, Gasser SM, Lingner J (2002) Intracellular trafficking of yeast telomerase components. *EMBO Rep* **3**(7): 652-659
- Teo SH, Jackson SP (1997) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J* **16**(15): 4788-4795
- Tesmer VM, Ford LP, Holt SE, Frank BC, Yi X, Aisner DL, Ouellette M, Shay JW, Wright WE (1999) Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6207-6216
- Teunissen AW, Steensma HY (1995) Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**(11): 1001-1013
- Teunissen AW, van den Berg JA, Steensma HY (1995) Localization of the dominant flocculation genes FLO5 and FLO8 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**(8): 735-745
- Theimer CA, Jady BE, Chim N, Richard P, Breece KE, Kiss T, Feigon J (2007) Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Mol Cell* **27**(6): 869-881
- Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, Vina J, Serrano M, Blasco MA (2008) Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* **135**(4): 609-622
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP (2006) Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* **17**(2): 955-965
- Trahan C, Dragon F (2009) Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human telomerase RNA affect its assembly into a pre-RNP. *RNA* **15**(2): 235-243
- Tseng SF, Lin JJ, Teng SC (2006) The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6327-6336

- Tseng SS, Weaver PL, Liu Y, Hitomi M, Tartakoff AM, Chang TH (1998) Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)<sup>+</sup> RNA export. *EMBO J* **17**(9): 2651-2662
- Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA (2009) A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell* **34**(1): 47-57
- van Steensel B, de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**(6618): 740-743
- Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* **323**(5914): 644-648
- Verdun RE, Karlseder J (2006) The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* **127**(4): 709-720
- Vinuela E, Algranati ID, Ochoa S (1967) Synthesis of virus-specific proteins in Escherichia coli infected with the RNA bacteriophage MS2. *Eur J Biochem* **1**(1): 3-11
- Virta-Pearlman V, Morris DK, Lundblad V (1996) Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev* **10**(24): 3094-3104
- Vodenicharov MD, Wellinger RJ (2006) DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol Cell* **24**(1): 127-137
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I (2001) The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**(6854): 432-435
- Wang Y, Patel DJ (1993) Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure* **1**(4): 263-282
- Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356): 737-738
- Wellinger RJ, Ethier K, Labrecque P, Zakian VA (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**(3): 423-433
- Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA (1993a) Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**(7): 4057-4065

- Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA (1993b) Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**(1): 51-60
- Wong JM, Kusdra L, Collins K (2002) Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* **4**(9): 731-736
- Wotton D, Shore D (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev* **11**(6): 748-760
- Wozniak RW, Rout MP, Aitchison JD (1998) Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol* **8**(5): 184-188
- Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA (1992) Saccharomyces telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* **6**(2): 197-210
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* **445**(7127): 559-562
- Yang CP, Chen YB, Meng FL, Zhou JQ (2006) Saccharomyces cerevisiae Est3p dimerizes in vitro and dimerization contributes to efficient telomere replication in vivo. *Nucleic Acids Res* **34**(2): 407-416
- Yao W, Roser D, Kohler A, Bradatsch B, Bassler J, Hurt E (2007) Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell* **26**(1): 51-62
- Ye JZ, Donigian JR, van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, Chait BT, de Lange T (2004a) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**(45): 47264-47271
- Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, de Lange T (2004b) POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**(14): 1649-1654
- Zakian VA, Blanton HM (1988) Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **8**(5): 2257-2260
- Zappulla DC, Goodrich K, Cech TR (2005) A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1072-1077

Zappulla DC, Sternglanz R, Leatherwood J (2002) Control of replication timing by a transcriptional silencer. *Curr Biol* **12**(11): 869-875

Zenklusen D, Vinciguerra P, Wyss JC, Stutz F (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* **22**(23): 8241-8253

Zhang ML, Tong XJ, Fu XH, Zhou BO, Wang J, Liao XH, Li QJ, Shen N, Ding J, Zhou JQ Yeast telomerase subunit Est1p has guanine quadruplex-promoting activity that is required for telomere elongation. *Nat Struct Mol Biol* **17**(2): 202-209

Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**(3): 347-352

Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP (2004) Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol Biol Cell* **15**(1): 81-90

Zou S, Wright DA, Voytas DF (1995) The *Saccharomyces* Ty5 retrotransposon family is associated with origins of DNA replication at the telomeres and the silent mating locus HMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(3): 920-924

## ANNEXE 1.

### Souches utilisées

Souche	génotype	source
W303	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	R. Jansen
BY4742	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Open Biosystems
BY4743	<i>Mat a/α his3/his3 leu2/leu2 lys2/LYS2</i> <i>MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Open Biosystems
CSHY76	<i>MATa/α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1</i> <i>tlc1::LEU2/TLC1 rad52::TRP1/RAD52.</i>	C. Greider
<i>tlc1</i>	<i>Mata, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1,</i> <i>TLC1::LEU2, RAD52::TRP1</i>	R. Wellinger
<i>tgs1</i>	W303 <i>ΔTGS1::KAN</i>	this study
RAP1 Myc13	W303, <i>RAP1-13xMyc KAN</i>	this study
<i>est1</i>	BY4743, <i>EST1/EST1::KAN</i>	Open Biosystems
<i>est2</i>	BY4743, <i>EST2/EST2::KAN</i>	R. Wellinger
<i>est3</i>	BY4743, <i>EST3/EST3::KAN</i>	Open Biosystems
<i>yku70</i>	W303 <i>YKU70::KAN</i>	R. Wellinger
Y464	<i>his, leu, trp, CRM1::KAN (pDC-crm1T539C-LEU2)</i>	M. Rosbash

Y464yku70	Y464 YKU70:: <i>HIS3</i>	this study	II
<i>xpo1-1</i>	W303 <i>XPO1::LEU2 (pKW456-xpo1-1-HIS)</i>	C. Guthrie	
<i>xpo1-1</i> <i>yku70</i>	<i>xpo1-1 YKU70::TRP1</i>	this study	
<i>Nsp1ts10A</i>	<i>Mat? Ade2-1, can1-100, leu2-3, lys1-1, ura3-52,</i> <i>NSP1:URA3, nsp1Ts10A-URA3</i>	P-E Gleizes	
<i>Nsp1ts10A</i> <i>yku70</i>	<i>Nsp1ts 10A YKU70::KAN</i>	F.G	
<i>mex67-5</i>	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, MEX67::HIS</i> <i>(pun100-leu2-mex67-5)</i>	C. Cole	
<i>mex67-5</i> <i>yku70</i>	<i>mex67-5 YKU70::TRP1</i>	F.G	
MS739	<i>Mat α, leu2-3, ura3-52, ade2-101, kar1-1</i>	P. Silver	
<i>kap123</i>	BY4742 <i>KAP123::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>kap120</i>	BY4742 <i>KAP120::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>msn5</i>	BY4742 <i>MSN5::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>sxm1</i>	BY4742 <i>SXMI::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>kap122</i>	BY4742 <i>KAP122::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>kap114</i>	BY4742 <i>KAP114::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>tell</i>	BY4742 <i>TEL1::KAN</i>	Open Biosystems	
<i>mre11</i>	BY4742 <i>MRE11::KAN</i>	Open Biosystems	

<i>xrs2</i>	BY4742 <i>XRS2::KAN</i>	Open Biosystems
PSY1201	<i>ura3-52 trp1-63 leu2-1 pse1-1</i>	P. Silver
PSY1199	<i>nmd5::HIS3 in PSY1183</i>	P. Silver
Y1171	<i>Mat<math>\alpha</math> ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 mtr10::HIS3</i>	E. Hurt
L5850	<i>leu2-3,112 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 trp1 srp1-31</i>	G. Fink
D307	<i>Mat a ade2-1 can1-100 his3::pCup1:GFP-LacI::HIS3</i> <i>leu2 trp1 ura3 PSI+ rad5-535 bar1 lys2 TelIV-R::LacO256:LEU2</i>	D.D'amours
RWY11	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200,</i> <i>leu2-<math>\Delta</math>1, VR-ADE2-T, tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2</i>	R. Wellinger
<i>cdc13-2</i>	<i>MVL26 tlc1::NatR +pVL438 CDC13 + YCp22-MS2-GFP</i> <i>+pRS314 TLC1 WT ou 10xMS2</i>	R. Wellinger
<i>MVL26</i>	<i>Mat <math>\alpha</math> est4-2</i>	V. Lundblad
RWY11	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-<math>\Delta</math>63, his3-<math>\Delta</math>200,</i> Live TLC1(LC) <i>leu2-<math>\Delta</math>1, VR-ADE2-T, tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2</i> <i>+YCp33 MS2-GFP</i>	R. Wellinger
<i>rif1 (LC)</i>	BY4741 <i>RIF1::KAN tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2+</i> <i>YCp33 MS2-GFP</i>	F.G.
<i>rif2 (LC)</i>	BY4741 <i>RIF2::KAN tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2+</i> <i>YCp33 MS2-GFP</i>	F.G.
<i>tell (LC)</i>	BY4741 <i>TEL1::KAN tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2+</i> <i>YCp33 MS2-GFP</i>	F.G.
<i>xrs2 (LC)</i>	BY4741 <i>XRS2::KAN tlc1<math>\Delta</math>:: LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2+</i>	F.G.

	<i>YCp33 MS2-GFP</i>	
<i>Rap1-</i>	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-Δ63, his3-Δ200</i>	F.G.
	<i>mCherry (LC) leu2-Δ1, VR-ADE2-T, tlc1Δ::LEU2 +pRS314-TLC1-10xMS2</i> <i>+YCp33 MS2-GFP RAP1-mCherry::KAN</i>	
<i>YV221</i>	<i>Mat a, ame1-4::TRP1, Sli14-VFP::KAN, Spc29-CFP::HPH,</i> <i>ura3-52, Tub1-mCherry::URA3</i>	J.Vogel

---

### Plasmides utilisés.

Plasmides	Description	Source
<i>pADCEN36</i> ou <i>pAZ1</i>	<i>TLC1, CEN, URA3</i>	R.J Wellinger
<i>pADCEN63</i>	<i>tlc1ΔstemIIC</i> (Stem Ku) dans <i>pADCEN36</i>	A.Dandjinou
<i>pNop1-GFP</i>	<i>NOPI-GFP</i> dans <i>pRS315</i> <i>URA3</i>	S. Abou Elela.
<i>pRL134</i>	<i>LOC1-6xMyc</i> cloné dans <i>pESC-URA3</i>	R. Long

---

---

<i>pVL399</i>	vecteur 2 $\mu$ vide, pADH- Term-ADH, <i>LEU2</i> .	V. Lundbald.
<i>pVL784</i>	<i>EST1</i> dans pVL399	V. Lundbald.
<i>pVL999</i>	<i>EST2</i> dans pVL399	V. Lundbald.
<i>pVL438</i>	<i>CDC13</i> dans <i>pl-URA3</i>	V. Lundbald.
<i>pJH132</i>	<i>NOPI-CFP</i> dans pRS313 <i>HIS3</i>	
<i>TLC1-WT</i>	<i>pRS314-TLC1-TRP</i>	A.Bah
<i>TLC1-10xMS2</i>	<i>pRS314-TLC1-10xMS2</i>	N.Laterreur

---

## **ANNEXE 2.**

Methods in Molecular biology, Soumis en Octobre 2009, en correction.

### **Visualizing RNAs in fixed and living yeast cells.**

**Franck Gallardo and Pascal Chartrand\***

Département de Biochimie

Université de Montréal

2900 Edouard-Montpetit

Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

\*Corresponding author :

Tel : 514-343-5684

Email :



## Summary

Localization of messenger RNA (mRNA) is a process used by eukaryotes to control the spatiotemporal expression of proteins involved in cellular motility, asymmetric cell division or polarized cell growth. A better understanding of this process relies on methods to detect specifically the position of a mRNA in fixed or living cells. This chapter presents methods to visualize mRNA in both fixed and living yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In fixed cells, position of mRNAs can be assessed by using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH), consisting in the hybridization of fluorescent probes that target a specific transcript *in situ*. In living cells, dynamics of mRNAs can be monitored using a bipartite system composed of MS2 stem-loops inserted in the mRNA of interest. These stem-loops are recognized specifically by the MS2 RNA-binding protein, fused to a fluorescent protein. *In vivo* association between the reporter (fluorescent MS2 protein) and the MS2-tagged mRNA reconstitutes active fluorescent ribonucleoparticles that can be followed by live cell imaging. Detailed protocols for the realization of these methods are provided and several technical considerations are discussed. Together, these methods provide very robust tools to determine the intracellular position and dynamics of your mRNA of interest in yeast.

**Key Words:** yeast, Fluorescent In Situ Hybridization, MS2-GFP, fluorescence microscopy, mRNA trafficking, live cell imaging

# 1. Introduction

## *1.1 Fluorescent in situ hybridization to visualize mRNAs in yeast*

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is a method which consists on the hybridization of a labelled nucleic acid probe (either DNA, RNA or modified nucleic acids) on a RNA target in formaldehyde-fixed cells. Following imaging under a microscope, the position of the target RNA can be determined within a cell. The advent of fluorescent dyes, of epifluorescence and confocal microscopes, and the appearance of CCD cameras lead to an expansion of RNA cytological studies based on FISH. For instance, direct or indirect detection of a poly(dT) oligonucleotide using fluorescent dyes would reveal the whole population of polyA<sup>+</sup> transcripts in yeast cells. Combined with yeast genetic tools, this lead to the identification of mutants affecting mRNA nuclear export (1). Sequencing of the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae* in 1996 opened the possibility of using nucleic acid sequences to determine the spatial distribution of specific transcripts within yeast. Synthetic oligonucleotide probes can now be designed, synthesized and labelled to detect any given RNA in a cell. While little evidence suggested that the intracellular distribution of a specific mRNA would be different from the bulk population of yeast polyA<sup>+</sup> transcripts, the discovery that some mRNAs were specifically sorted to the bud tip of yeast cells changed that perception (2). Since then, FISH has been used to study new mechanisms regulating transcription, splicing, nuclear export and cytoplasmic localization of specific transcripts in yeast (3-5). Association of subpopulations of mRNAs to organelles like mitochondria or ER has also been studied using this technique (6, 7).

The FISH method presented here is based on the use of modified oligonucleotide probes for *in situ* hybridization. While these probes can be expensive, they can be designed to target specific regions of a given RNA and they can be directly labelled with fluorophore dyes, which

offers an increased signal to noise ratio. For low abundance RNA, multiple probes targeting to different regions of an RNA can be designed to increase the signal. There are other types of probes for FISH and other types of probe labelling that have been developed, which are not discussed in this article. Refer to reference (8) for details about these alternatives.

## ***1.2 Visualization of mRNAs in living yeast using fluorescent proteins***

The development of FISH opened the possibility of visualizing specific mRNAs in yeast. However, this technique is limited by the fixation step that freezes the cell in a certain state. Efforts to develop live cell imaging of mRNAs lead to the creation of green fluorescent protein (GFP) reporter fused to specific RNA-binding proteins. While several systems have been developed over the years (9-12), the first and most widely used is based on the MS2 phage protein: the MS2-GFP system. The coat protein from the MS2 bacteriophage (MS2-CP) binds with high specificity to an RNA stem-loop structure of 19 nucleotides in the MS2 phage genome (13). Over the years, the MS2 coat protein has been engineered so that it can be fused to any protein and tethered to any RNA containing the MS2 stem-loop motif. MS2 coat protein variants have been generated which do not multimerize, that show high affinity to the RNA stem-loop and still bind RNA as a dimer. One such variant, the V29I-d1FG mutant, shows very high affinity to the RNA stem-loop (Kd of 40 nM) (14). Moreover, a cytosine to uracil mutation at position -5 of the 19 nucleotide MS2 RNA stem-loop further increases its affinity for the MS2 coat protein (15). Combining the V29I-d1FG MS2 coat protein mutant with the cytosine-variant RNA stem-loop provides very strong binding properties for the MS2 protein. These MS2 protein and RNA stem-loop mutants are used in the MS2-GFP system in yeast and sequences of both MS2 RNA stem loops and protein are provided (*see Fig. 1*).

The MS2-GFP system involves the expression of two constructs: a fusion of the MS2 coat protein to GFP or any fluorescent protein (MS2-CP-GFP), and a multimer of the MS2 RNA stem-loop sequence in the mRNA to be visualized. When the MS2-CP-GFP protein binds to the RNA stem-loops, it acts as a fluorescent beacon that allows the detection of this mRNA within a cell by live cell microscopy. The initial studies have shown that MS2-CP-GFP protein is highly specific for mRNAs containing MS2 stem-loops in yeast (**9, 10**). The main advantage of using this system over the expression of a GFP-tagged endogenous RNA-binding protein is that MS2-CP-GFP is specific to the RNA containing MS2 stem-loops, while the endogenous RNA-binding protein may bind several mRNAs and reflect the behaviour of all of them. Altogether, this system offers the benefits of a specific detection of MS2 stem loop-tagged mRNAs by standard epifluorescence or confocal microscopy, and the study of RNA dynamics in living yeast cells.

## **2. Materials**

### ***2.1 Yeast cultures***

1. YEP (yeast rich media): dilute 10g of Yeast extract and 20g Bacto peptone in 900mL H<sub>2</sub>O. Autoclave and add 100mL of 20% sterile glucose solution.

YC (yeast selection media) without amino acids for proper selection. Dilute 1,7g of a minimum AA mix, 6,7g Yeast Nitrogen base without AA and required AA to 900mL H<sub>2</sub>O. Autoclave then add 100mL of 20% sterile glucose solution.

2. Carbon source: 20% D-glucose or 30% galactose, dilute in water and filter sterilize.

3. Culture tubes

4. Erlenmeyers

### ***2.2 Fluorescent in situ hybridization***

All solutions and equipment should be RNase-free. For solutions, treat with diethylpyrocarbonate (DEPC), which can be added at 0.1 mL per 100 mL of solution, incubated overnight and autoclaved. For equipment, decontaminate by treating with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, then rinse 10 times with DEPC-treated water. Always wear gloves to avoid RNase contaminations.

### 2.2.1 Buffers

1. 1X Buffer B: 1.2M Sorbitol, 0.1M potassium phosphate, pH 7.5. Store at 4°C.
2. 10xPBS: 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4M NaCl, 40mM KCl, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5. Treat with DEPC, autoclave and store at room temperature.
3. 20xSSC: dissolve 175.3g of NaCl and 88.2g of Sodium Citrate in 800mL of water. Adjust pH to 7.0 with HCl. Adjust volume to 1 liter with water. Autoclave and store at room temperature.
4. Sodium carbonate buffer: dissolve 106 mg of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 84 mg of NaHCO<sub>3</sub> in 10mL of DEPC water. Adjust pH to 8.8 with HCl. Keep at -20°C.
5. Mounting medium: Dissolve 100 mg of *p*-phenylenediamine (Sigma, St-Louis, MO) in 10 ml of 10xPBS and adjust to pH 8.0 with 0.5 M of sodium bicarbonate, pH 9.0 freshly prepared. Add 90 ml of glycerol. Wrap in aluminum foil and store at -20°C. Discard when the color is too dark.

### 2.2.2 Enzymes and chemicals

1. Dried Zymolyase 100T: 100mg of Zymolyase 100T (Seikagaku, Japan) should be resuspended in 1x Buffer B, aliquoted at 60 µg per tube and lyophilized. These aliquots can be stored at -20°C in a dessicator. (*see Note 1*)
2. 32% Paraformaldehyde (Electron Microscope Sciences, Fort Washington, PA) (*see Note 2*)

3. Poly-L-lysine (Sigma, St-Louis, MO). Dilute to 0.01% with DEPC treated water.
4. Cy3 monoreactive dye pack (GE Healthcare, Piscataway, NJ)
5. Formamide . Store at 4°C.
6. Pepstatin. Prepare a 850 µg/ml stock with ethanol. Store at -20°C.
7. Leupeptin. Prepare a 800 µg/ml stock with DEPC-treated water. Store at -20°C.
8. Aprotinin. Prepare a 1 mg/ml stock with DEPC-treated water. Store at -20°C.
9. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Prepare a 17.5 mg/ml stock with ethanol. Store at -20°C.
10. 40U/µL RNase inhibitor (Fermentas, Glen Burnie, MD)
11. 200 mM Vanadium Ribosyl Complex (VRC) (New England Biolabs, Ipswich, MA)
12. 20mg/mL RNase-free BSA (Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN)
13. β-mercaptoethanol
14. Triton X-100
15. 5 mg/ml solution of a 1:1 mixture of sonicated salmon sperm DNA and *E.coli* tRNA
16. 70% ethanol prepared with DEPC-treated water. Keep at -20°C.

### *2.2.3 Additional Supplies*

1. Coplin Jars for 22 x 22 x 0.15 mm coverslips (Fisher Scientific, Pittsburgh,PA)
2. Glass coverslips (22 x 22 x 0.15 mm) and microscope slides (72 x 55 x 1 mm), both from Fisher Scientific.
3. Sephadex G25 or G50 column, RNase-free (Roche Applied Bioscience, Indianapolis, IN)
4. Glass plates (16 x 20 cm)

5. Parafilm M (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)
6. Tweezers
7. Six-wells plastic plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)

### ***2.3 Live cell imaging***

1. Sealing Wax: 1:1:1 mixture of vaselin, lanillin and paraffin, all from Sigma (St-Louis, MO)

## **3. Methods**

### ***3.1 Fluorescent in situ hybridization***

#### ***3.1.1 Probe preparation***

##### *Probe Design*

Oligonucleotide DNA probes are synthesized with amino-allyl modified Thymine residues, which allows the covalent coupling of fluorescent molecules. These probes are usually 50 nucleotides long, with an amino-allyl modified Thymine residue incorporated every 10 nucleotide (resulting in five amino-allyl Thymine residues per probe), if possible. For efficient hybridization, the total G+C content of the probe should be near 50%. If a highly expressed mRNA has to be visualized by FISH, a 5' or 3' end labelled oligonucleotide can be used instead.

##### *Probe Labelling*

Probe labelling occurs when the desired activated fluorophore reacts with the terminal amino moiety of the amino-allyl modified Thymine residues. We routinely use the FluoroLink Cy3 monoreactive dye, used to label antibodies, for labelling probes. However, any activated fluorophore can be used. As a result, the fluorophore is covalently linked to the probe. This step avoids the use of a fluorescent secondary antibody to detect the probe and thus, greatly increases signal to noise ratio. Moreover, several mRNAs can be detected using different probes labelled

with different fluorophores in a same experiment. We have successfully used the duo Cy3/Cy5 to detect multiple mRNAs in the same cell *in situ*.

1. Dry 10 $\mu$ g of probe in a speed vacuum. Do not heat.
2. Resuspend probe in 35 $\mu$ L of sodium carbonate buffer pH 8.8, freshly made.
3. Dissolve the content of one vial of monoreactive fluorophore dye in 30 $\mu$ L of DEPC water. See user information for more details. One vial can be used to label two probes.
4. Add 15 $\mu$ L of dye to the probe and incubate at room temperature for 24 to 36h in the dark, with occasional vigorous vortexing.

#### *Probe purification.*

1. Prepare a Sephadex G-25 or G-50 column. Open the upper cap, then break the bottom seal. Let the column rest 5 min and discard flowthrough.
2. Spin the column 2 min at 2500g in a 15mL Falcon tube covered with aluminum foil.
3. Discard the flowthrough, use a new 15mL Falcon tube
5. Add the 50 $\mu$ L probe reaction to the center of the column (*see Note 3*).
6. Spin column for 4 min at 2500g in a 15mL Falcon tube covered with aluminum foil.

Recover the purified probe. The probe solution should elute from the free (column bound) dye. Discard

column and determine incorporation efficiency.

#### *Calculation of fluorophore incorporation*

This section uses the Cy3 dye as an example. The same calculation applies to any other fluorophore, using its appropriate Molecular Extinction Coefficient.

1. Dilute the labeled probe and take OD at 260nm (DNA) and 552 nm (for Cy3).
2. Calculate the Molecular Extinction Coefficient (MEC). MEC for Cy3 fluorophore is 150000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. The MEC of your oligonucleotide probe is the sum of each A,G,C and T of your

probe. The MEC for adenosine is  $15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , for cytidine  $7400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , for guanine  $11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  and thymidine  $8700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . One can consider an average of  $10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  per base and do the calculation with this value.

3. Calculate incorporation efficiency by using these equations:

$$[\text{Cy3dye}] = \frac{A_{552}}{150000}$$

$$[\text{Oligo}] = \frac{(A_{260} - 0.08 (A_{552}))}{\text{Oligo MEC}}$$

$$\text{Incorporation (Dye/oligo)} = \frac{[\text{Cy3dye}]}{[\text{Oligo}]}$$

While 100% incorporation can rarely be achieved, we routinely obtain 70 to 90% labelling efficiency.

### *3.1.2 Preparation of poly-L-lysine coated coverslips*

Yeast cells do not stick very well to glass coverslips. To maintain yeasts spheroplasts on the surface of coverslips during hybridization and washing steps, the coverslips must be pre-coated with poly-L-lysine.

1. Perform chemical stripping by boiling coverslips in 250mL of 0.1N HCl for 30 min in a glass beaker. Cover the beaker with aluminum foil while boiling.
2. Let cool down to room temperature and wash 10 times with distilled water.
3. Autoclave coverslips in 100mL of distilled water. These coverslips can be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for several months.
4. Put one coverslip in each well of a six-well tissue culture plate. Let dry, then drop  $200\mu\text{L}$  of 0.01% poly-L-lysine DEPC on each coverslip. The poly-L-lysine solution should cover at least 75% of the coverslip surface.

5. Incubate 2 min at room temperature, aspirate the excess of solution and let dry at room temperature (2 to 3h). (*see Note 4*).
6. After drying, wash each well with DEPC-treated water three times 10 min at room temperature. While drying, coverslips may have stuck to the bottom of the well, so during washes with water, slow shaking of the six-well plate should help free the coverslips.
7. Rest each coverslip on the wall of the wells, with the coated surface on top. Aspirate excess liquid and let dry (from 2-3h to overnight). If a coverslip falls into the well, it will stick to the plastic surface.
8. After drying, put the coverslips back into the wells, the coated surfaces facing up. These plates can be kept for several months at room temperature.

### *3.1.3 Fixation and spheroplasting of yeast cells*

Fixation is performed with the crosslinking agent paraformaldehyde. Since paraformaldehyde is a very toxic reagent, it should be manipulated under the hood. Keep the cells on ice to decrease protease and RNase activities.

1. Yeasts are grown in 50 mL of the appropriate media until they reach early to mid-log phase ( $OD_{600}$  between 0.2-0.4) (*see Note 5*).
2. Fix cells for 45 min at room temperature by adding 6.25 mL of 32% paraformaldehyde freshly prepared directly into the cell culture. Transfer into a 50 mL Falcon tube and invert gently every 10 min (*see Note 6*).
3. Pellet the cells by centrifuging 4 min at 2500g at 4°C.
4. Wash cell pellet three times with ice-cold buffer B. Between each wash, centrifuge 4 min at 2500g at 4°C. DO NOT resuspend the pellet when washing.
5. Gently resuspend the cells (do not vortex) in 1mL of buffer B containing 20mM vanadyl

ribonucleoside complex (VRC), 28mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.06 mg/mL

phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 $\mu$ g/mL pepstatin, 5 $\mu$ g/mL leupeptin, 5 $\mu$ g/mL aprotinin, and 120U/mL of RNase inhibitor.

6. Transfer the cells into a tube containing dried Zymolyase 100T or oxalyticase (*see Note 1*).
7. Incubate the cells for 16 to 20 min at 30°C (*see Note 7*).
8. Pellet the spheroplasts by centrifuging 4 min at 2500g at 4°C.
9. Wash spheroplast pellet with 1mL of ice-cold buffer B. DO NOT resuspend cells.
10. Add 750 $\mu$ L of ice-cold buffer B to the pellet and resuspend gently.
11. Drop 100 $\mu$ L of spheroplast solution on each poly-L-lysine coated coverslip in a six-well plate and let adhere to coverslips for 30 min at 4°C.
12. Wash coverslips with 3 mL of ice-cold buffer B and aspirate excess. DO NOT drop the liquid directly on the spheroplasts, as this may disperse them.
13. Dehydrate the spheroplasts by adding 5 mL of 70% ethanol prepared with DEPC-treated water. DO NOT drop the ethanol directly on the spheroplasts. Incubate at least 20 min at –20°C before performing the *in situ* hybridization. The spheroplasts can be kept at -20°C for a maximum of two months.

### 3.1.4 *In situ* hybridization

All the following steps must be performed in dimmed light to avoid bleaching of the labelled probes. Using several probes against the same transcript may be preferable if the expression level of the mRNA is low. We have successfully used this FISH method to detect a broad variety of RNAs expressed at endogenous levels in yeast (*see Fig. 2*).

#### *Probe preparation*

For each coverslip used in the hybridization, prepare one tube of probe. We strongly suggest the use of two coverslips per experiment in order to have a duplicate if one is broken during manipulations.

1. Dilute and pool the probe(s) to a final concentration of 1ng/ $\mu$ L in DEPC water.
2. Mix 10 $\mu$ L of probe solution with 4  $\mu$ L of a 5 mg/ml solution of a 1:1 mixture of sonicated salmon sperm DNA and *E.coli* tRNA. Lyophilize in a speed vacuum (cover with aluminum foil when drying).
3. Resuspend the probes in 12 $\mu$ L of 80% formamide, 10mM sodium phosphate, pH 7.
4. Keep covered at room temperature.

#### *Rehydration and hybridization*

1. Cover a 16 x 20 cm glass plate with a layer of parafilm by placing its paper side up and rubbing firmly to make it adhere to the glass. This glass plate will be used at a later step.
2. Put the coverslips containing spheroplasted cells in a Coplin Jar and wash twice with 8mL of 2xSSC for 5 min at room temperature. (*see Note 8*).
3. Incubate in 2xSSC 40% formamide for 5 min at room temperature. During this incubation, heat your probe solution for 3 min at 95°C. (*see Note 9*).
4. Dilute the probe solution with 12 $\mu$ L of 4xSSC, 20 mM VRC, 4  $\mu$ g/mL RNase free BSA and 50U of RNase inhibitor.
5. For the hybridization, use the glass plate wrapped with the parafilm sheet. The probe solution (24 $\mu$ L) is dropped on the parafilm. Lay the coverslip on the drop, the surface of the coverslip containing the spheroplasts should face the drop. (*see Note 10*).
6. Cover the coverslips with another parafilm sheet and seal both parafilm sheets around the coverslips with a non-sharp object. DO NOT move the coverslips after they have been laid down. This creates a humidified hybridization chamber that is required to ensure good

hybridization. Wrap in aluminum foil and incubate overnight in the dark at 37°C. (*see Note 11*).

#### *Washing*

1. After hybridization, remove coverslips from the parafilm sheet and put them back in a Coplin Jar. At this step, the Coplin jar should always be wrapped in aluminum foil.
2. Wash twice with 8 ml of pre-heated 2xSSC 40% formamide at 37°C for 15 min.
3. Wash with 8mL of 2xSSC 0,1% Triton X-100 for 15 min at room temperature.
4. Wash twice with 8 ml of 1xSSC at room temperature for 15 min.

#### *Nuclear staining and mounting on slides.*

1. Add 8 ml of 1xPBS containing 1ng/ml of 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA) and let stand 2 min at room temperature.
2. Drop 10 µl of mounting medium on a glass slide. Lay down a coverslip on the drop, with the surface containing the spheroplasts facing the drop.
3. Remove excess liquid with Kimwipes.
4. Seal the coverslip by applying nail polish on the sides. Let dry at room temperature and store at -20°C. (*see Note 12*)

### **3.2 *in vivo* visualization of mRNAs using fluorescent proteins.**

#### *3.2.1 Generating an mRNA with MS2 stem-loops*

The first step is to insert the MS2 stem-loops in your mRNA of interest. These stem-loops can be inserted in the 5' or 3'UTR of the mRNA, as long as they do not interfere with the expression, stability, localization or function of the transcript (*see Fig. 3A*). There are different MS2 stem-loop repeats currently available, with either 2, 6, 12 or 24 repeats (*see Note 13*).

Insertion of the MS2 stem-loops in the 5' UTR gives the advantage of being able to visualize the transcription site of the RNA (*see Fig. 3B*). However, it can interfere with translation. Thus, 3'UTR insertion should be favoured, even if this implies the detection of only the mature form of your mRNA.

For the expression of mRNA with MS2 stem-loops, three approaches can be used. The first approach is to use a fusion reporter mRNA containing an heterologous open reading frame with MS2 stem-loops in its 3'UTR. For instance, a vector expressing a *lacZ*-6xMS2 reporter (YEP195-*lacZ*-6xMS2) can be used to study the role of specific RNA zipcodes or localization elements involved in mRNA trafficking. Besides the *lacZ* ORF and six MS2 stem-loops, it contains an *ADH2* 3'UTR with multiple cloning site for insertion of heterologous DNA. An example with the *ASH1* bud-localization zipcode cloned in the 3'UTR of the *lacZ*-6xMS2 reporter is shown in **Fig. 3C**.

The second approach is to directly clone the MS2 stem-loops in the 3'UTR of the mRNA of interest, expressed from a plasmid. In this case, one can use the MS2 stem-loops from the pSL-MS2-6 plasmid (**9**), which contains several restriction sites for sub-cloning in the 3'UTR. The MS2 stem-loops can also be inserted in the 5'UTR of the gene of interest. Finally, a third approach is to directly integrate the MS2 stem-loops in the chromosome locus expressing your mRNA of interest (**16**). A PCR cassette containing the MS2 stem-loops and a selectable marker is integrated by homologous recombination in the 3'UTR of the gene, a few nucleotides downstream of the stop codon. The presence of *loxP* sites flanking both sides of the marker allows the Cre-mediated excision of the marker, so only the MS2 stem-loops remain in the transcript. This approach allows the visualization of a specific mRNA expressed at endogenous levels, from its own promoter.

### 3.2.2 Choosing the right MS2-CP-GFP expression vector

For the expression of the MS2-CP-GFP protein in yeast, the original expression vector (pG14-MS2-CP-GFP) developed by the Singer lab was based on the pG14 vector (2 $\mu$ , *LEU2*) containing the MS2-CP-GFP fusion under the control of the *GPD1* promoter (9). An SV40 nuclear localization signal and an HA tag was inserted upstream of the MS2-CP-GFP open reading frame. This plasmid allows constitutive expression of a nuclear-localized MS2-CP-GFP protein. Only the MS2-fluorescent protein tethered to an mRNA containing MS2 stem-loops can be exported out of the nucleus and accumulate in the cytoplasm.

Problems with this vector are the high level of MS2-CP-GFP expression and the impossibility of detecting nuclear RNAs. New versions of this expression plasmid are now available, with lower expression levels (a CEN, *LEU2* plasmid YCP111-MS2-GFP), without nuclear localization signal (YCP111-MS2-CP-GFP- $\Delta$ NLS) for detection of transcripts in the nucleus (see Fig 3A), or with an inducible promoter (*MET25* promoter) (16). Another version, with the RedStar fluorescent protein has been recently published (17).

### 3.2.3 Preparing slides for live cell imaging

When cells are mounted directly on the slide, very few of them will immediately stick on the surface and imaging may be difficult due to cell movements. To get rid of this problem, cells can be placed on a small layer of agar containing the appropriate growth medium. Using this method, cells can grow for hours under the microscope, if phototoxicity is avoided (see Note 14).

1. Prepare a solution of your minimal media with a 4% carbon source as a final concentration and 1% agar.
2. Keep sterile in an eppendorf tube. Tubes can be stored for months at 4°C.
3. Heat the medium at 95°C until it melts.

4. Drop 200  $\mu\text{L}$  of melted agar solution in the center of a glass slide and quickly cover with another slide creating a sandwich, with agar between the two.
5. When the agar has solidified, open the sandwich by turning the upper slide. This will release the slide and the thin layer of agar should stay on the bottom slide.

### *3.2.4 Live cell imaging*

1. Both plasmids are transformed in your strain of interest and selected in the appropriate medium.
2. Grow different clones overnight in 5 ml of minimum selective media. (*see Note 5*)
3. Dilute overnight culture in 5 mL of appropriate media and let grow until they reach  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0.2-0.3. Induce mRNA expression if necessary.
4. Drop 20  $\mu\text{L}$  of cell suspension on a freshly prepared agar coated slide and cover with a coverslip.
5. Seal with melted Wax (1:1:1 mixture of paraffin, vaselin and lanillin). Do not use nail polish (*see Note 15*).
6. Place slide in temperature-controlled chamber at 30°C (*see Note 16*).
7. Perform imaging using an epifluorescence or confocal microscope (*see Note 17*).

## **4. Notes**

1. While Zymolyase 100T works fine with well expressed mRNAs, spheroplasting that yields a more sensitive FISH signal is obtained using recombinant oxalyticase purified in the lab (see Supplementary data from reference (**18**) for details on expression and purification of recombinant oxalyticase).

2. The quality of the formaldehyde is crucial for the preservation and detection of small details by FISH. We always use EM grade ultrapure, single-usage sealed ampules of formaldehyde from Electron Microscope Sciences.
3. Missing the center will allow the probe preparation to sweep between the resin and the tube, resulting in free dye contamination at the end of the purification and a misleading measurement of labeling efficiency. A second purification step using a new Sephadex column can be used if free dye is still present with the probe.
4. Putting coverslips under a hood will shorten drying time.
5. To minimize the natural autofluorescence of cells, avoid growing the yeasts over mid-log phase ( $OD_{600nm}$  0.2-0.6). Moreover, for laboratory strains that have the *ade2* marker, adding adenine at 20  $\mu\text{g/ml}$  directly to your growth media helps decrease autofluorescence due to the accumulation of an oxidized metabolite of phosphoribosyl-aminoimidazole, an adenine precursor, that gives the pink color to *ade2* yeast colonies. Yeast cells grown in YPD medium, which is poor in adenine, show more autofluorescence. This is especially important when imaging at 488 nm since this pigment is fluorescent in the green emission channel and may interfere with the GFP signal.
6. Colocalization between a specific mRNA and proteins can be performed using FISH and GFP-tagged proteins expressed in yeast. However, formaldehyde fixation strongly reduces GFP fluorescence due to a decreased pH of the medium after addition of formaldehyde. For such colocalization experiments, growing cells at room temperature (allows for better folding of GFP) induce a stronger fluorescence in the GFP channel and will counteract the effect of formaldehyde. Moreover, fixing the cells in DEPC water instead of yeast media clearly helps to conserve GFP fluorescence. In this case, yeast cells can be centrifuged, resuspended in DEPC water and fixed with formaldehyde.

7. Incubation time with lyticase may depend on the yeast strain, as some strains have thicker cell wall. Assays should be performed to optimize incubation time.
8. To remember which side of the coverslips the spheroplasted yeasts are, mark one side of the Coplin jar with a black pen and always put the coverslip with their side containing the spheroplasts facing the marked side of the jar.
9. The quality of the formamide is important in order to avoid non-specific signal. Store the formamide stock at 4°C and do not keep for more than a year. Formamide concentration determines the stringency of the hybridization. Formamide concentration can range from 10% (for poly(dT) probe detecting polyA+ mRNA) to 50% (for probes with high G+C content).
10. Avoid air bubbles between the probe solution and the coverslip; it will affect hybridization and induce a low FISH signal.
11. An incubation of 2-3 hrs can be performed if the target RNA is highly expressed and the hybridization signal is very strong. For most cases, we strongly suggest overnight incubation.
12. While the slides can be stored at -20°C for months without fading, capture images as soon as possible, as fluorescence intensity decreases with time even in the presence of anti-fading agent.
13. MS2 stem-loop repeats can be deleted during amplification in bacteria. We use the HB101 bacterial strain (a rec-deficient strain) grown at 30°C to efficiently amplify our plasmids without deletion or recombination of the MS2 stem-loops.
14. Try to minimize phototoxicity when imaging. Phototoxicity is generated by illumination under the microscope, which induce reactive oxygen species and cellular damages. Cells respond to such damage, which can affect the behaviour of your RNA. This may not be very important for short acquisition time (1 or 2 min), but it can be a problem if you want to image over long time period. To evaluate phototoxicity, let the cell grow after imaging. If cells have taken too much damage, they will stop dividing. Adding an anti-oxidant to the media can delay this effect.

15. Do not seal the slides with nail polish for live cell imaging. The solvent in the nail polish will affect GFP fluorescence and can damage cells.

16. Using a chamber with controlled temperature allows efficient growth of yeasts and is preferred when doing time-lapse imaging over long period. We can easily image several cell cycles using such chamber. Also, ATP-dependent dynamics of RNA is affected by the temperature.

17. Before starting GFP-labelled mRNAs in live cell, we strongly suggest to perform a FISH on your mRNA construction to show that the foci you observe with the MS2-CP-GFP system colocalize with the MS2-tagged mRNA *in situ*.

**Acknowledgements:** Authors thank Dr. Emmanuelle Querido for critical reading of the manuscript and Zhifa Shen for sharing results. This work is supported by grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. FG is supported by a fellowship from the Terry Fox Foundation from the National Cancer Institute of Canada. PC is a Senior Scholar from the Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

**References:**

1. Amberg, D. C., Goldstein, A.L., Cole, C.N. (1992) Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* **6**, 1173-89.
2. Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.-P. (1997) Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383-87.

3. Zenklusen, D., Larson, D. R., and Singer, R. H. (2008) Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1263-71.
4. Long, R. M., Elliott, D.J., Stutz, F., Rosbash, M., Singer, R.H. (1995) Spatial consequences of defective processing of specific yeast mRNAs revealed by fluorescent in situ hybridization. *RNA* **1**, 1071-78.
5. Saavedra, C., Tung, K. S., Amberg, D. C., Hopper, A. K., and Cole, C. N. (1996) Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **10**, 1608-20.
6. Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R. H., and Jacq, C. (2007) Mitochondria-associated Yeast mRNAs and the Biogenesis of Molecular Complexes. *Mol. Biol. Cell* **18**, 362-68.
7. Aronov, S., Gelin-Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E., and Gerst, J. E. (2007) mRNAs Encoding Polarity and Exocytosis Factors Are Cotransported with the Cortical Endoplasmic Reticulum to the Incipient Bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3441-55.
8. Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2000) Sensitive and high-resolution detection of RNA in situ. *Methods in Enzymol* **318**, 493-506.
9. Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., and Long, R.M (1998) Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**, 437-45.
10. Beach, D. L., Salmon, E. D., and Bloom, K. (1999) Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Current Biology* **9**, 569-78.
11. Brodsky, A. S., and Silver, P. A. (2000) Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* **6**, 1737-49.

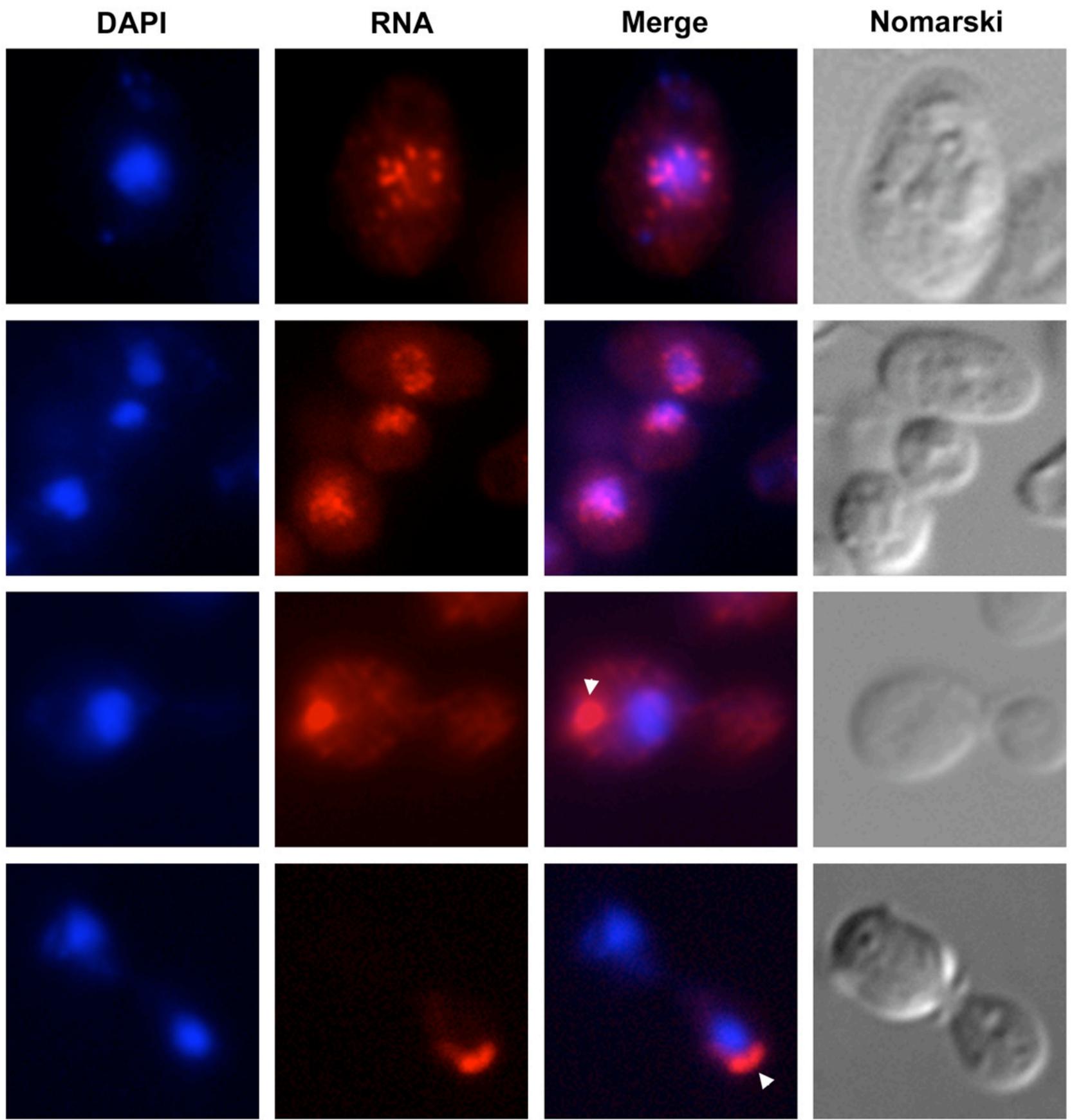
12. Daigle, N., and Ellenberg, J. (2007)  $\lambda_N$ -GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Meth* **4**, 633-36.
13. Bernardi, A., Spahr, P.F. (1972) Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**, 3033-37.
14. Lim, F., and Peabody, D. S. (1994) Mutations that increase the affinity of a translational repressor for RNA. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3748-52.
15. Talbot, S. J., Goodman, S., Bates, S. R. E., Fishwick, C. W. G., and Stockley, P. G. (1990) Use of synthetic oligoribonucleotides to probe RNA-protein interactions in the MS2 translational operator complex. *Nucl. Acids Res.* **18**, 3521-28.
16. Haim, L., Zipor, G., Aronov, S., and Gerst, J. E. (2007) A genomic integration method to visualize localization of endogenous mRNAs in living yeast. *Nat Meth* **4**, 409-12.
17. Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.-G., and Jansen, R.-P. (2006) Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Current Biology* **16**, 1538-43.
18. Gallardo, F., Olivier, C., Dandjinou, A.T., Wellinger, R.J., Chartrand, P. (2008) TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *The Embo Journal* **27**, 748-57.

**A**

ATG GCT TCT AAC TTT ACT CAG TTC GTT CTC GTC GAC AAT GGC GGA ACT  
 M A S N F T Q F V L V D N G G T  
 GGC GAC GTG ACT GTC GCC CCA AGC AAC TTC GCT AAC GGG **ATC** GCT GAA  
 G D V T V A P S N F A N G I A E  
 TGG ATC AGC TCT AAC TCG CGT TCA CAG GCT TAC AAA GTA ACC TGT AGC  
 W I S S N S R S Q A Y K V T C S  
 GTT CGT CAG AGC TCT GCG CAG AAT CGC AAA TAC ACC ATC AAA GTC GAG  
 V R Q S S A Q N R K Y T I K V E  
 GTG CCT AAA\*GGC GCC TGG CGT TCG TAC TTA AAT ATG GAA CTA ACC ATT  
 V P K G A W R S Y L N M E L T I  
 CCA ATT TTC GCC ACG AAT TCC GAC TGC GAG CTT ATT GTT AAG GCA ATG  
 P I F A T N S D C E L I V K A M  
 CAA GGT CTC CTA AAA GAT GGA AAC CCG ATT CCC TCA GCA ATC GCA GCA  
 Q G L L K D G N P I P S A I A A  
 AAC TCC GGC ATC TAC GCG GAT CC  
 N S G I Y A D

**B**

	<b>U C</b> A A G - C G - C A G - C U - A A - U C - G A - U	<b>U C</b> A A G - C G - C A G - C U - A A - U C - G A - U
<b>GGAUCCUAAGGUACCUA</b> AAUUGCCUAGAAA <i>BamH1</i> <i>Kpn1</i>	<b>CUGCAGGUCGACUCU</b> AGAAA <i>Pst1</i> <i>Sal1</i> <i>Xba1</i>	<b>CUGCAGUAUUCCCGGU</b> UCAUUAGAUCU <i>Pst1</i> <i>Sma1</i> <i>BglII</i>

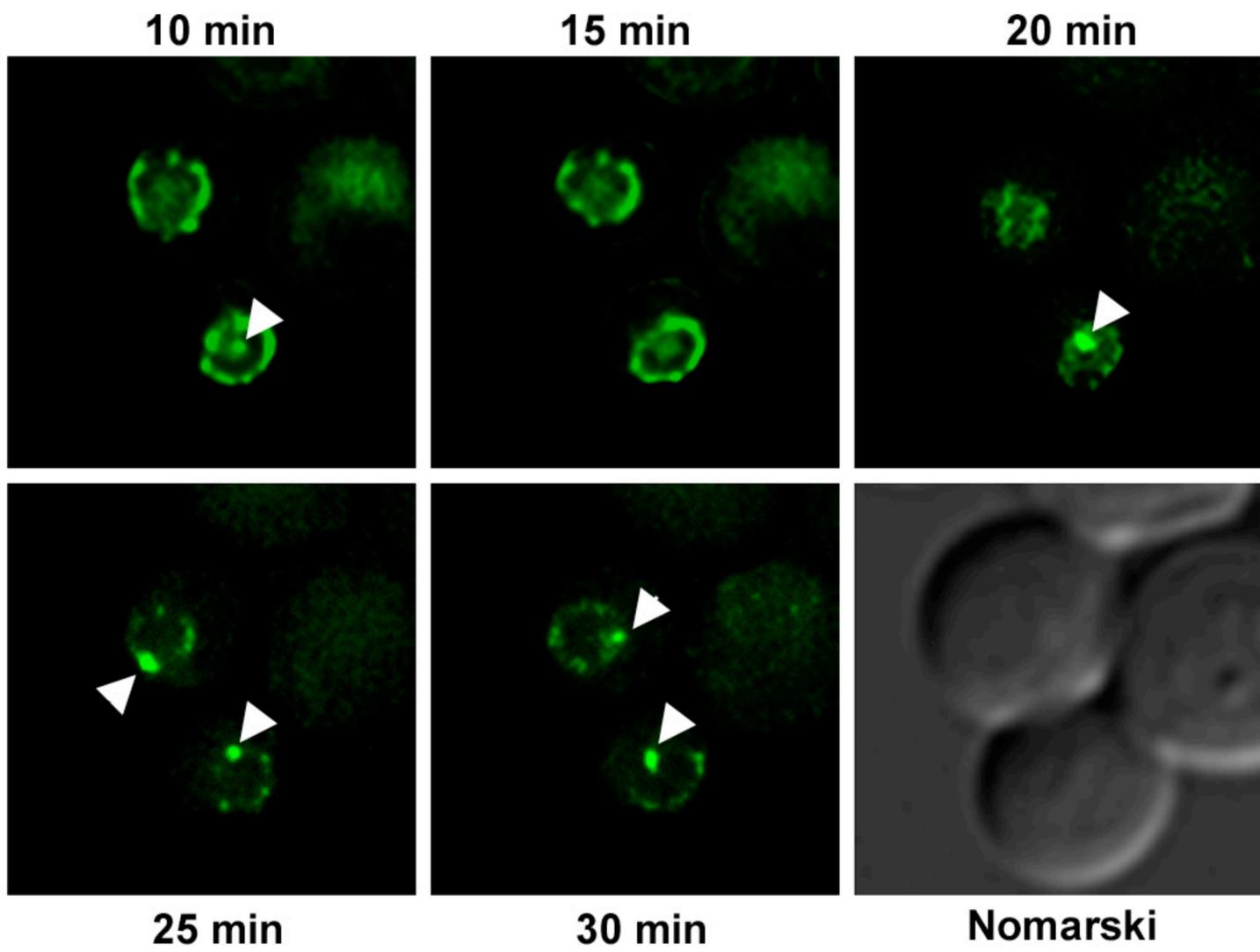


**A**YCP111 MS2-GFP $\Delta$ NLS.

YIP211-24xMS2-ASH1 5'UTR-LacZ



YEP195-LacZ-6xMS2-ASH1 3'UTR

**B****C**