



**Université de Montréal**

**Dissection du processus d'export des ARNm nucléaires par des  
approches de molécules uniques chez *Saccharomyces cerevisiae***

**par Mark-Albert Saroufim**

**Département de Biochimie, Faculté de Médecine**

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de  
l'obtention du grade de M.Sc en Biochimie option Génétique Moléculaire

Août, 2014

©, Mark-Albert Saroufim, 2014

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire est intitulé  
**Dissection du processus d'export des ARNm nucléaires par des approches de molécules  
uniques chez *Saccharomyces cerevisiae***

Présenté par :  
Mark-Albert Saroufim

Évalué par un jury composé des membres suivants :

Dr. Pascal Chartrand, président-rapporteur

Dr. Daniel Zenklusen, directeur de recherche

Dr. Eric Lécuyer, membre du jury

## Résumé et mots clés

Enfermer le porteur de l'information génétique dans le noyau a obligé la cellule à créer un système de transport complexe, qui permet l'export d'un ARNm du noyau au cytoplasme. Le mécanisme général de l'export des ARNm est encore mal connu, même si les facteurs principaux ont été découverts il y a longtemps. De récents progrès en microscopie nous ont permis d'étudier directement le comportement des ARNm durant le processus d'export. Durant ma maîtrise, nous avons été capables de localiser et suivre des ARNm en temps réel pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons créé un gène rapporteur en mettant le gène *GLT1* sous le contrôle du promoteur *GALI*. Nous avons aussi marqué l'ARNm de *GLT1* avec plusieurs boucles PP7. L'ARNm sera visible après l'attachement de plusieurs protéines PP7-GFP aux boucles. En utilisant la technique d'imagerie en cellules vivantes, nous sommes capables de visualiser et suivre chaque ARNm, depuis son relâchement du site de transcription jusqu'à l'export. Une fois relâché du site de transcription, l'ARNm diffuse librement dans le nucléoplasme, mais une fois à la périphérie nucléaire, il commence à « scanner » l'enveloppe nucléaire avant d'être exporté. Nous avons trouvé que le « scanning » dépend de la présence des Myosin Like Proteins (Mlp1p et Mlp2p), protéines qui forment le panier nucléaire, car suite à la délétion de *MLP1* et *MLP2*, les ARNm n'étaient plus capables de « scanner ». Nous avons également trouvé que la partie C-terminale de Mlp1p était nécessaire au « scanning ». De plus, suite à la délétion du gène *TOM1*, gène codant pour une ubiquitine ligase, les ARNm ont un comportement similaire aux ARNm d'une souche  $\Delta mlp1/mlp2$ , suggérant que le « scanning » permet à Tom1p d'ubiquitiner Yra1p, ce qui causera son relâchement de l'ARNm. Également, nous avons

montré que les ARNm endogènes *MDN1* et *CBL2* scannent aussi la périphérie nucléaire. Ensemble, nos résultats suggèrent que le scanning est un processus par lequel passent tout les ARNm nucléaire lorsqu'ils se retrouvent à la périphérie du noyau, pour initier plusieurs étapes de réarrangements nécessaires à leurs export.

De plus, nous avons examiné le rôle de Yhr127p, une protéine nouvellement identifiée qui se lie à l'ARN. Après avoir marqué cette protéine avec la GFP, nous avons montré qu'elle forme des foci dans le noyau et que ces derniers vont disparaître suite à l'arrêt de la transcription. La délétion de *YHR127* a conduit à une augmentation de la transcription de quelques gènes spécifiques, mais n'affecte pas la capacité de la cellule à exporter les ARNm. Nos résultats suggèrent que cette protéine joue un rôle dans la régulation de la transcription et/ou dans la stabilité de l'ARNm.

Mots-clés : Export des ARNm; Régulation de l'expression des gènes; Single molecule resolution microscopy; Live Cell Imaging; Organisation nucléaire; Mlp1p et Mlp2p; *YHR127*

## Abstract and keywords

In eukaryotic cells, the processes of RNA and protein synthesis are spatially separated into two distinct compartments. With this division, a complex pathway of nucleocytoplasmic RNA export has evolved, which to date remains poorly understood. Recent advances in single-molecule microscopy have enabled direct studies focused on investigating the dynamics and kinetics of RNA export. In this Master thesis, we present the first real time visualization of mRNA export in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We first generated a *GLT1* reporter under the control of the inducible *GAL1* promoter, in which the *GLT1* mRNA was tagged with an array of PP7 repeats and detected by exogenous PP7-GFP binding protein. Using a single-molecule live cell imaging approach, we were able to visualize and track the behavior of individual mRNAs from the site of transcription to the point of export. Interestingly, we found that once released from the transcription site, single mRNAs diffuse freely in the nucleoplasm, but once they reach the nuclear periphery, they scan the periphery before being exported to the cytoplasm. This scanning behavior was dependent on Myosin Like Proteins (Mlp1p and Mlp2p), which form the basket of the Nuclear Pore Complex (NPC), as mRNAs were not retained at the periphery and were rapidly released into the nucleoplasm in *mlp1p/mlp2p* double mutant cells. Specifically, we found that the C-terminal part of Mlp1p was important for scanning. Furthermore, mRNAs from cells depleted of the E3 ubiquitin ligase *TOM1* had a similar phenotype to mRNAs in *mlp1p/mlp2p* double mutant cells, suggesting a role for scanning in the Tom1p-mediated release of Yra1p from the RNA. Lastly, we confirmed that endogenous *MDN1* and *CBL2* mRNAs also exhibit scanning behaviour. Taken together, our results suggest that mRNAs scanning the nuclear periphery is

a general behaviour for all mRNAs to initiate the mRNA export process, allowing mRNP arrangement required for export to occur at the nuclear periphery.

In addition, we investigated the role of *YHR127*, a newly identified RNA binding protein, in RNA biogenesis. Notably, we show that GFP-tagged YHR127p formed distinct foci in the nucleus, which were lost upon transcription arrest. Deletion of *YHR127* led to an increase in transcript levels of specific genes, but not to a global accumulation of mRNAs in the nucleus, suggesting a role for this protein in regulating transcription and/or mRNA stability.

Keywords: mRNA export; gene expression regulation, single molecule resolution microscopy; live cell imaging; nuclear organization, Mlp1p and Mlp2p; *YHR127*

# Table des matières

|  |       |
|--|-------|
| Liste des figures.....   | xiii  |
| Liste des vidéos.....  | xvi   |
| Liste des tableaux.....  | xviii |
| Liste des abréviations.....  | xix   |
| Remerciements.....   | 1     |
| Chapitre I : Introduction en Français.....   | 2     |
| 1.1 Classification des organismes vivants.....   | 2     |
| 1.2 Découverte du porteur de l'information génétique.....                                      | 3     |
| 1.3 Dogme central de la biologie moléculaire.....  | 4     |
| 1.4 L'organisation nucléaire chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....                         | 5     |
| 1.5 Import et export des protéines du noyau.....   | 7     |
| 1.6 Vue d'ensemble de la transcription chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....               | 9     |
| 1.7 La composition et la structure du pore nucléaire chez la levure <i>S. cerevisiae</i> ..... | 11    |
| 1.8 Comment les ARNm deviennent-ils « matures »?.....  | 15    |
| 1.9 Comment les ARNm se comportent-ils une fois dans le noyau?.....                            | 18    |
| 1.10 Comment l'ARNm se retrouvera-t-il dans le cytoplasme?.....                                | 20    |



|   |    |
|---|----|
| 1.11 Quelles sont les protéines qui forment le panier nucléaire?.....                     | 22 |
| 1.12 Mlp1p peut former des structures en spirales et des domaines globulaires.....        | 23 |
| 1.13 Mlp1p et Mlp2p se trouvent du côté nucléaire du noyau.....                           | 23 |
| 1.14 Les Mlps interagissent avec les nucléoporines et les facteurs d'export des ARNm..... | 27 |
| 1.15 Mlp1p interagit directement avec Nab2p.....  | 29 |
| 1.16 Les Mlps jouent un rôle dans l'organisation nucléaire.....                           | 30 |
| 1.17 Les Mlps jouent un rôle dans le contrôle de qualité des ARNm.....                    | 31 |
| 1.18 Est-ce que les Mlps jouent un rôle durant le processus d'export des ARNm?.....       | 32 |
| 1.19 Transcription à la périphérie et le rôle des Mlps dans ce processus.....             | 34 |
| 1.20 Le phénomène du « gene gating ».....   | 35 |
| 1.21 Quels sont les objectifs de notre projet de recherche?.....                          | 36 |
| 1.22 Pourquoi <i>S. cerevisiae</i> comme organisme modèle?.....                           | 39 |
| 1.23 Qu'elle est l'approche expérimentale utilisée pour atteindre notre objectif?.....    | 40 |
| 1.24 Hybridation in situ en fluorescence.....   | 41 |
| 1.25 Le système PP7.....  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 1.26 Comment suivre et déterminer la trajectoire des ARNm?.....                                      | 44 |
| Chapitre II : Introduction in English.....   | 46 |
| Chapitre III: Materials and methods.....   | 49 |
| Chapitre IV: Results.....  | 57 |
| Section I: Studying mRNA export in yeast.....  | 57 |
| 4.1.1 Construction and characterization of the GAL1p-24PP7-GLT1 reporter.....                        | 57 |
| 4.1.2 Imaging RNAs in real time.....   | 61 |
| 4.1.3 Examining behaviour of the 24PP7- <i>GLT1</i> mRNA in the yeast nucleus.....                   | 64 |
| 4.1.4 Scanning is a general behaviour of nuclear mRNAs.....  | 66 |
| 4.1.5 Quantitative analysis of mRNA scanning behaviour.....  | 69 |
| 4.1.6 Nuclear mRNAs have similar behaviours.....   | 72 |
| 4.1.7 What mediates mRNA scanning along the nuclear envelope?.....                                   | 76 |
| 4.1.8 In the absence of Mlps, mRNAs at the periphery behave similar to free nucleoplasmic mRNAs..... | 82 |
| 4.1.9 mRNAs scan the nuclear envelope in an NPC-independent manner.....                              | 85 |
| 4.1.10 The C-terminus of Mlp1p is required for mRNA scanning.....                                    | 89 |
| 4.1.11 mRNAs stop at the periphery to allow Tom1p to ubiquitinate Yra1p.....                         | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.1.12 mRNAs do not scan for quality control purposes involving Sto1p, Pml1p and Pml39p.....                                   | 95  |
| Section II: Testing the gene gating hypothesis.....  | 97  |
| 4.2.1 24PP7-GLT1 mRNA is not directly exported to the cytoplasm.....   | 97  |
| 4.2.2 <i>GALI</i> -12PP7 might be directly exported to the cytoplasm.....  | 99  |
| 4.2.3 <i>GALI</i> mRNAs are rarely seen in the nucleoplasm.....  | 101 |
| Section III: Characterization of the novel Yhr127 protein using microscopy.....  | 103 |
| 4.3.1 Deletion of YHR127 does not affect mRNA export but affects the mRNA levels of genes involved in ribosome biogenesis..... | 103 |
| 4.3.2 Yhr127p is enriched in nuclear foci.....   | 105 |
| 4.3.3 The formation and maintenance of Yhr127p foci requires ongoing transcription.....  | 107 |
| Chapitre V : Discussion in English.....  | 109 |
| Chapitre VI : Discussion en Français.....  | 113 |
| 6.1 Bref aperçu des résultats.....   | 113 |
| 6.2 Les Mlps permettent aux ARNm de « scanner ».....   | 114 |
| 6.3 Le « scanning», un processus répandu chez d'autres organismes eucaryotes?.....   | 115 |
| 6.4 Les Mlps maintiennent les ARNm à la périphérie.....  | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.5 Quels rôles jouent Mlp2p durant le « scanning » ?.....                                     | 118 |
| 6.6 Pourquoi les ARNm scannent-ils et que peut cela signifier?.....                            | 119 |
| 6.7 Qu'elles protéines liant l'ARN aident les ARNm à « scanner »?.....                         | 121 |
| 6.8 L'interaction entre Nab2p et Mlp1p peut être indirectement liée au processus d'export..... | 123 |
| 6.9 Nab2p pourrait jouer un rôle de contrôle de qualité.....                                   | 124 |
| 6.10 Les ARNm scannent-ils sur les Mlps pour être contrôlés?.....                              | 125 |
| 6.11 La présence du panier nucléaire peut être régulée.....                                    | 126 |
| 6.12 La voie choisie pour sortir du noyau diffère d'un ARNm à l'autre.....                     | 127 |
| 6.13 L'attachement d'un gène à la périphérie et l'effet sur la transcription.....              | 129 |
| 6.14 YHR127p joue un rôle durant la transcription.....   | 131 |
| Conclusions et Perspectives.....   | 133 |
| Bibliographie.....   | 136 |
| Figures en supplémentaires.....  | 146 |
| Annexe.....  | 151 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Le parcours d'un ARNm de la transcription jusqu'à la dégradation.....  | 10 |
| <b>Figure 2</b> : La structure du pore nucléaire.....  | 12 |
| <b>Figure 3</b> : La formation d'un mRNP.....  | 17 |
| <b>Figure 4</b> : Les Mlps forment le panier nucléaire.....  | 26 |
| <b>Figure 5</b> : Différents modèles pour l'export de l'ARNm.....  | 37 |
| <b>Figure 6</b> : Détecter des ARN dans une seule cellule.....   | 43 |
| <b>Figure 7</b> : The <i>GLT1</i> reporter construct.....  | 59 |
| <b>Figure 8</b> : Imaging of nuclear 24PP7- <i>GLT1</i> mRNAs.....   | 63 |
| <b>Figure 9</b> : <i>CLB2</i> -12PP7 and <i>MDN1</i> -12PP7 mRNAs also scan the nuclear periphery.....                               | 68 |
| <b>Figure 10</b> : Localization precision of our software that uses 2D Gaussian fitting to detect mRNAs.....                         | 70 |
| <b>Figure 11</b> : 24PP7 <i>GLT1</i> mRNAs, <i>MDN1</i> 12PP7 and <i>CLB2</i> 12PP7 have similar behaviors...                        | 74 |
| <b>Figure 12</b> : Deleting the Mlps causes nuclear accumulation of polyA mRNAs and abolishes scanning at the nuclear periphery..... | 77 |
| <b>Figure 13</b> : mRNAs scanning at the periphery is abolished when Mlp proteins are deleted....                                    | 79 |
| <b>Figure 14</b> : Losing the Mlps and the nuclear basket affects the behavior of mRNAs.....   | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 15:</b> mRNAs at the periphery behave similarly to mRNAs in the nucleoplasm when Mlp proteins are deleted.....                                    | 83  |
| <b>Figure 16:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> mRNA still scans the periphery in a clustering mutant.....   | 86  |
| <b>Figure 17:</b> The behavior of mRNAs in a clustering mutant and a WT strain are similar.....   | 88  |
| <b>Figure 18:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> mRNAs are not able to scan the nuclear periphery after deleting the C-terminal of Mlp1p.....                           | 90  |
| <b>Figure 19:</b> The C-terminal of Mlp1p is crucial for maintaining mRNAs at the periphery.....  | 92  |
| <b>Figure 20:</b> Deleting <i>TOM1</i> causes mRNAs to be more mobile at the periphery, similarly to <i>MLP1/2</i> deletion.....                            | 94  |
| <b>Figure 21:</b> mRNAs do not scan the nuclear periphery for quality control purposes involving Sto1p, Pml1p and Pml39p.....                               | 96  |
| <b>Figure 22:</b> 24xPP7- <i>GLT1</i> mRNAs are released directly into the nucleoplasm even if the transcription site is at the periphery.....              | 98  |
| <b>Figure 23:</b> <i>GALI</i> mRNAs are not seen in the nucleoplasm except when they are tagged with 12xPP7 repeats in the 5'UTR.....                       | 100 |
| <b>Figure 24:</b> <i>GALI</i> mRNAs are rarely observed in the nucleoplasm.....   | 102 |
| <b>Figure 25:</b> Deleting <i>YHR127</i> does not cause a polyA RNA accumulation in the nucleus, but an increase in the numbers of some specific mRNAs..... | 104 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 26:</b> Yhr127p form foci in the nucleus, are excluded from the nucleolus and do not colocalize with the SPB..... | 106 |
| <b>Figure 27:</b> Yhr127p foci disappear after transcription arrest.....  | 108 |
| <b>Figure S1:</b> <i>CLB2</i> -12PP7 mRNA exported to the cytoplasm after scanning the nuclear envelope.....                | 146 |
| <b>Figure S2:</b> Deleting <i>NUP60</i> abolishes scanning of 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA at the periphery.....          | 147 |
| <b>Figure S3:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in <i>nab2F73D</i> cells.....            | 148 |
| <b>Figure S4:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a $\Delta tom1$ cells..               | 148 |
| <b>Figure S5:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a $\Delta sto1$ cells..               | 149 |
| <b>Figure S6:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a $\Delta pml1$ cells..               | 149 |
| <b>Figure S7:</b> 24PP7- <i>GLT1</i> -12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a $\Delta pml39$ cells.....           | 150 |
| <b>Figure S8:</b> 24PP7 <i>GLT1</i> mRNAs imaged at an interval of 18.5ms and 37ms behave similarly.....                    | 150 |

## Liste des vidéos

CD disponible en annexe.

**Vidéo 1:** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches sauvages (Figure 8B)

**Vidéo 2:** ARNms provenant de la transcription du gène CLB2p-24PP7-*CLB2*, marqués par eGFP + *Nup188*-2xmCherry après avoir filmé des souches sauvages (Figure 9A)

**Vidéo 3:** ARNms provenant de la transcription du gène MDN1p-24PP7-*MDN1*, marqués par eGFP + *Nup188*-2xmCherry après avoir filmé des souches sauvages (Figure 9B)

**Vidéo 4 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches  $\Delta mlp1/2$  (Figure 12C)

**Vidéo 5 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches  $\Delta nup133$  (301-1157) « clustering mutant » (Figure 16B)

**Vidéo 6 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des  $\Delta$  C-term *mlp1* (Figure 18B)

**Vidéo 7 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*-GLT1term, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches sauvages (Figure 22A)

**Vidéo 8 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*-GAL1term, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches sauvages (Figure 22B)



**Vidéo 9 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-*GALI*-12PP7, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches sauvages (Figure 23A)

**Vidéo 10 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-12PP7-*GALI*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des souches sauvages (Figure 23B)

**Vidéo 11 :** Protéines Yhr127p marquées par eGFP après avoir filmé des souches sauvages (Figure 26A).

**Vidéo S1 :** ARNms provenant de la transcription du gène CLB2p-*CLB2*-12PP7, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules sauvages (Figure S1).

**Vidéo S2 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules  $\Delta nup60$  (Figure S1).

**Vidéo S3 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules *nab2F73D* (Figure S2)

**Vidéo S4 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules  $\Delta tom1$  (Figure S3)

**Vidéo S5 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules  $\Delta sto1$  (Figure S4)

**Vidéo S6 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules  $\Delta pml1$  (Figure S5)

**Vidéo S7 :** ARNms provenant de la transcription du gène GAL1p-24PP7-*GLT1*, marqués par eGFP + *Nup188*-dtomato après avoir filmé des cellules  $\Delta pml39$  (Figure S6)

## Liste des tableaux

**Tableau S1** : Background, description et géotypes de chacune des souches utilisé.....151

**Tableau S2** : Nom, numéro et séquence des primer utilisés pour construire ou tester les souches.....152

# Liste des abréviations

**2 Dimensions:** 2D

**3 Dimensions:** 3D

**Acide Désoxyribo Nucléique:** ADN

**Acide Ribonucléique:** ARN

**Acide Ribo Nucléique de transfert:**  
ARNt

**Acide Ribo Nucléique messenger:** ARNm

**ARN polymerase I:** ARN polI

**Cleavage and polyadenylation factor:**  
CPF

**Cleavage factor IA:** CFIA

**Complexe de pré-initiation:** PIC

**C-Terminal Domain:** CTD

**Cap Binding Complex:** CBC

**Dalton:** Da

**Enveloppe Nucléaire:** NE

**Fluorescence in situ hybridization:** FISH

**Green fluorescent protein:** GFP

**GTPase-activating protein:** GAP

**GTP Exchange Factor:** GEF

**Immuno Electron Microscopy:** IEM

**Maximum projection:** MAX projection

**Messenger ribonucleoprotein:** mRNP

**Millisecondes:** ms

**Minutes:** min

**Myosin Like Proteins 1 et 2:** Mlp1p et  
Mlp2p

**Nanometer:** nm

**Nuclear Export Signal:** NES

**Nuclear Localization Signal:** NLS

**Nucléoporine:** Nup

**Open Reading Frame:** ORF

**Phénylalanine-Glycine: FG**

**Pore Nucléaire: NPC**

**Regulator of Ty1 transposition 103:**

Rtt103

**Réticulum Endoplasmique: RE**

**RNA Binding Domain: RBD**

**RNA polymerase II: RNA polII**

**RNA-trafficking protein 1: Rat1**

*Saccharomyces cerevisiae: S. Cerevisiae*

**Secondes: sec**

**Serine-Arginine proteins: SR proteins**

**Spindle Pole Body: SPB**

**Transcription Export: TREX**

**Untranslated region: UTR**

**Wild-Type: WT**

**Yellow fluorescent protein: YFP**

# Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, Dr. Daniel Zenklusen pour sa patience, son aide durant ma maîtrise et durant l'écriture de ce mémoire. Merci de m'avoir accueilli et intégré au sein de son équipe, et de m'avoir consacré du temps même dans les moments où il n'en avait pas.

Je veux également remercier tous les membres du laboratoire, spécialement Cornelia et Pierre pour le temps et l'effort qu'ils ont bien voulu me consacrer afin de m'aider durant l'écriture et la correction de ce mémoire.

Je réserve des remerciements particuliers à ma famille, à qui je dédie mon mémoire, et qui par ses appuis et ses encouragements m'ont donné la force de surmonter tous les obstacles. Merci à mon père Sarkis, ma mère Marguerite et mon frère Carlo, dont les encouragements et l'amour inconditionnel m'accompagnent depuis toujours. Merci également à mon grand-père Albert et mon oncle Carlos pour tous leurs supports pendant mes années au bac et à la maîtrise. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier

Finalement, mes souhaits les plus chers seront de remercier vivement toutes les personnes, qui de près ou de loin, se sont impliquées dans la réalisation de ce mémoire, tant par leur soutien personnel, que professionnel.

# Chapitre I : Introduction en Français

## 1.1 Classification des organismes vivants

Il est connu depuis longtemps que la vie est basée sur des unités morphologiques appelées cellules. La formulation de ce concept est attribuée à une publication de 1838 de Matthias Schleiden et Theodor Schwann, mais ses origines découlent d'observations faites durant le 17<sup>ème</sup> siècle par les premiers microscopistes. On distingue 2 catégories de cellules : les eucaryotes et les procaryotes. Les eucaryotes ont une organelle spéciale, le noyau, qui renferme l'information génétique, tandis que les procaryotes n'ont pas de noyau. Ces derniers, qui comprennent différents types de bactéries et les archées, sont majoritairement unicellulaires et ont une structure assez simple. Elles sont délimitées par une membrane cellulaire qui à son tour est entourée par une paroi cellulaire. Leurs cytoplasmes contiennent leur unique chromosome, les Acides Ribo Nucléiques (ARN) comme les Acide Ribo Nucléiques messenger (ARNm) et Acide Ribo Nucléiques de transfert (ARNt), mais aussi les ribosomes et les protéines nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire. Même s'ils ont une forme et grandeur semblable aux procaryotes, les archées possèdent des gènes et plusieurs voies métaboliques semblables aux eucaryotes, particulièrement les enzymes impliquées dans la transcription et la traduction<sup>1,2</sup>.

Cependant, les eucaryotes contiennent une multitude d'organelles renfermées par une membrane ayant chacune une fonction spécifique. Une de ces organelles est le noyau, qui est l'endroit où l'information génétique de la cellule est stockée. Cette information est contenue dans l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) (dans la séquence des nucléotides de l'ADN) qui,

associé à des protéines, forme la chromatine. C'est à l'intérieur du noyau que se produit la transcription. La transcription d'un gène codant pour une protéine va donner naissance à un ARNm. L'ARNm sera exporté du noyau vers le cytoplasme puis l'information enfermée dans ce dernier sera traduite en protéine par des ribosomes. Par ailleurs, la transcription de gènes non-codants donne naissance à des ARN qui ne seront pas traduits en protéines, comme les ARN non-codant et ARN de transfert par exemple<sup>3,4</sup>.

## **1.2 Découverte du porteur de l'information génétique**

Mais comment a-t-on découvert que l'ADN était le porteur de l'information génétique? Durant les années 1860, des chercheurs ont observés dans le noyau de cellules eucaryotes des corpuscules allongés qui ont été appelés chromosomes. Ils ont été isolés pour la première fois en 1869 par Friedrich Miescher à partir de noyaux de leucocytes provenant du pus de pansements chirurgicaux<sup>5</sup>. Suite à une série d'expériences faites durant les années 1880 par Theodor Boveri, ce dernier démontré que les chromosomes sont les vecteurs de l'hérédité<sup>6</sup>.

Plusieurs années après que le groupe de T.H. Morgan ai démontré que les chromosomes sont le support des gènes, il a été proposé que l'information génétique est composée d'ADN, d'ARN ou de protéines<sup>7</sup>. Les biochimistes semblaient pencher vers les protéines, mais tout cela a changé quand des expériences faites en utilisant des bactéries ont données des résultats inattendus. En 1928, Frederick Griffith (médecin et microbiologiste), travaillait sur 2 souches de bactéries, l'une pathogène et l'autre inoffensive<sup>7</sup>. Il a constaté que lorsqu'il tuait les bactéries pathogènes par la chaleur et combinait leurs résidus avec des

bactéries inoffensives vivantes, celles-ci devenaient pathogènes. Il déduit que ce phénomène était causé par une substance chimique venant des bactéries pathogènes mortes et lysées<sup>7</sup>.

Ces travaux ont ouverts la voie à de nouvelles études. Pendant plusieurs années, le microbiologiste Oswald Avery a essayé de trouver la substance qui permet la transformation des cellules inoffensives en pathogènes<sup>8</sup>. Il a commencé par purifier plusieurs substances chimiques venant de ces bactéries pathogènes tuées par la chaleur, puis a mélangé les bactéries non pathogènes avec chacune des substances purifiées<sup>8</sup>. Seul le mélange avec de l'ADN a permis aux cellules inoffensives de devenir pathogènes<sup>8</sup>. Il a déduit que l'ADN est bien le support de l'information génétique<sup>8</sup>.

### **1.3 Dogme central de la biologie moléculaire**

Une fois l'ADN identifié comme le porteur de l'information génétique, comment peut-on traduire l'information codée dans l'ADN en protéines? La réponse est venue de Francis Crick qui résuma la relation entre l'ADN, l'ARN et les protéines par ce qui est appelé maintenant le dogme central de la biologie moléculaire<sup>9</sup>. L'ADN qui se retrouve dans le noyau de la cellule est transcrit, produisant ainsi un ARNm. L'ARNm, qui est une copie d'une portion d'ADN appelée gène, est utilisé comme messenger. L'ARNm sera exporté du noyau vers le cytoplasme où sa traduction en protéines par les ribosomes a lieu. Le terme transcription indique que l'information enfermée dans l'ADN passe à ARNm dans la même langue (bases azotées), tandis que lors de la traduction de l'ARNm en protéine, il y a changement de langue (bases azotées en acides aminés).



## 1.4 L'organisation nucléaire chez la levure *S. cerevisiae*

Comme mentionné ci-haut, le noyau renferme le porteur de l'information génétique, formant ainsi une organelle bien définie. Comme pour les autres organismes eucaryotes, le noyau de la levure *S. cerevisiae* est hautement organisé. Enfermant les 16 chromosomes, le noyau est formé d'une double membrane lipidique, appelée enveloppe nucléaire (NE). Cette dernière est en continu avec le réticulum endoplasmique (RE). Accroché à cette enveloppe nucléaire, le « Spindle Pole Body » (SPB) permet l'organisation des microtubules et par conséquent la division cellulaire, comme le centrosome.

Un des plus grands sous-compartiments dans le noyau des levures est le nucléole. Ce dernier prend la forme d'un croissant et occupe environ 1/3 du noyau. Il se trouve du côté opposé au SPB<sup>10</sup>. Le nucléole est le site où se produit la transcription des gènes ribosomiaux par l'ARN polymérase I (ARN polI). C'est aussi le lieu d'assemblage des sous-unités du ribosome. Sa morphologie est influencée par le niveau de croissance de la cellule, peut-être à cause de l'adaptation de la cellule au taux de production des ribosomes<sup>11</sup>. Ce compartiment n'est pas physiquement isolé du reste du noyau (nucléoplasme), parce qu'il n'y a pas de membrane qui les séparent. Cela permet un grand nombre d'échanges de protéines entre le nucléole et les autres éléments du noyau.

Un autre type de compartiment sous-nucléaire provient du regroupement des 32 télomères de la levure *S. cerevisiae* en 3 à 8 foci qui se trouvent principalement à la périphérie du noyau. La présence d'une très grande concentration de protéine Sir4p (un « silencing factor ») permet sa formation. Pour empêcher la propagation de la chromatine silencieuse (hétéro-chromatine), ces compartiments contiennent des frontières qui sont caractérisées par

la présence d'histones acétylés Htz1 et par la présence en grande quantité des protéines Sir<sup>12,13</sup>. L'enveloppe nucléaire joue un rôle dans la création de ces compartiments. Avec l'aide des protéines Sir4p et le complexe yKu70/yKu80, les télomères peuvent être attachés à l'enveloppe nucléaire.

Récemment, un groupe dirigé par O'Sullivan a montré que les chromosomes de la levure *S. Cerevisiae* ne se retrouvent pas aléatoirement dans le noyau et que certains chromosomes interagissent entre eux, tandis que d'autres n'interagissent pas du tout ensemble<sup>14</sup>. Ils ont observés cela en utilisant la technique de « conformation capture approach » faite à l'échelle du génome en entier (genome wide), qui permet de connaître les interactions entre chromosome. Également, le groupe dirigé par Zimmer a montré qu'il y a un renfermement/confinement de plusieurs loci dans ce qui est appelé « gene territories », ce qui reflète les restrictions spatiales imposées sur les chromosomes<sup>15</sup>.

La chromatine dans le noyau n'est pas statique, mais plutôt en mouvement constant. En utilisant la technique de « Rapid time-lapse imaging », dans laquelle des images du noyau sont prises pendant 150 millisecondes (ms) à un intervalle de 1.5 ms pendant 5 minutes (min) pour surveiller le mouvement d'un locus, une étude a montré que la chromatine chez la levure peut faire de petits mouvements aléatoires (moins de 0.2µm dans 1.5 secondes) ou bien des mouvements directionnels (plus que 0.5µm dans 10.5 sec)<sup>16</sup>. Les régions chromosomiques (aussi appelées locus) inactives qui se retrouvent à la périphérie font de petits mouvements tandis que les gènes actifs dans le milieu du noyau bougent plus.

Cependant, l'enveloppe nucléaire peut avoir aussi un effet positif sur la transcription. Des études ont montré que plusieurs gènes inductibles s'associent à l'enveloppe nucléaire suite à leur activation<sup>17-19</sup>. Également dans le noyau, il y a des compartiments qui permettent la réparation des cassures doubles brins. Le nucléoplasme est le site de réparation des cassures par recombinaison homologue avec l'aide de Rad52p<sup>20</sup>, tandis que le pore nucléaire permet la réparation des cassures double brin via d'autres mécanismes<sup>21</sup>.

## 1.5 Import et export des protéines du noyau

Dans une cellule, il y a toujours un « cross talk » entre les organelles et ce n'est pas différent pour le noyau. Ce dernier exporte des ARN et des protéines vers le cytoplasme, mais aussi des protéines y sont importées. Pour qu'une protéine du cytoplasme soit importée dans le noyau, elle doit contenir un « Nuclear Localization Signal » (NLS) reconnu par un transporteur qui va la conduire dans le noyau, tandis que pour une protéine soit exportée du noyau vers le cytoplasme, elle doit contenir un « Nuclear Export Signal » (NES). Cependant, des protéines de petites tailles peuvent diffuser et passer à travers le pore nucléaire sans la présence de NLS ou de NES<sup>22</sup>. Les chercheurs pensaient qu'une protéine ne doit pas être plus grande que 60kDa pour pouvoir diffuser à travers le pore, mais une étude en 2007 a montré que des protéines d'environ 100kDa peuvent facilement diffuser à travers le NPC<sup>22</sup>.

Le transport des protéines du cytoplasme vers le noyau et du noyau vers le cytoplasme est médié par des transporteurs qui s'appellent karyophérines<sup>23</sup>. Ces derniers interagissent avec leurs « cargos » à partir de la séquence du NLS ou NES. Les karyophérines qui importent les « cargos » dans le noyau sont appelés importines, tandis que ceux qui exportent les « cargos » vers le cytoplasme sont appelés exportines. Le transport nucléo-cytoplasmique

requiert la formation et le maintien de gradients à travers l'enveloppe nucléaire par des GTPases et des ATPases, qui se retrouvent dans le noyau et le cytoplasme<sup>24,25</sup>. Donc c'est un transport qui requiert de l'énergie.

La direction du transport de chaque karyophérine est dictée par leurs interactions avec le « cargo » et la protéine Ran. Cette dernière existe sous 2 formes. Dans le noyau, Ran est liée à une molécule de GTP avec l'aide d'un « GTP Exchange Factor » (RanGEF). Mais dans le cytoplasme, Ran est liée à une molécule de GDP à cause de la présence de la « GTPase-activating protein » RanGAP. Les études ont montré que lorsqu'une protéine doit être importée dans le noyau, la protéine Kap60p (Homologue de karyophérine  $\alpha$ ) se lie au NLS et la protéine Kap95p (Homologue de karyophérine  $\beta$ ) stabilise cette interaction dans le cytoplasme. Lorsque le complexe cargo + karyophérines arrive dans le milieu du pore, Kap95p interagit avec les « nucléoporines FG » (L'explication des nucléoporines FG se fera plus loin<sup>23,26,27</sup>). Ran-GTP fournit l'énergie nécessaire à ce processus en se liant au complexe Kap60p-Kap95p-cargo quand il arrive dans le noyau, via Kap95p, permettant ainsi le relâchement du « cargo » dans le nucléoplasme. Il faut mentionner que les « cargos » n'ont pas tous le même NLS. Il existe donc plusieurs variétés de NLS correspondant à plusieurs variétés de karyophérines<sup>28</sup>.

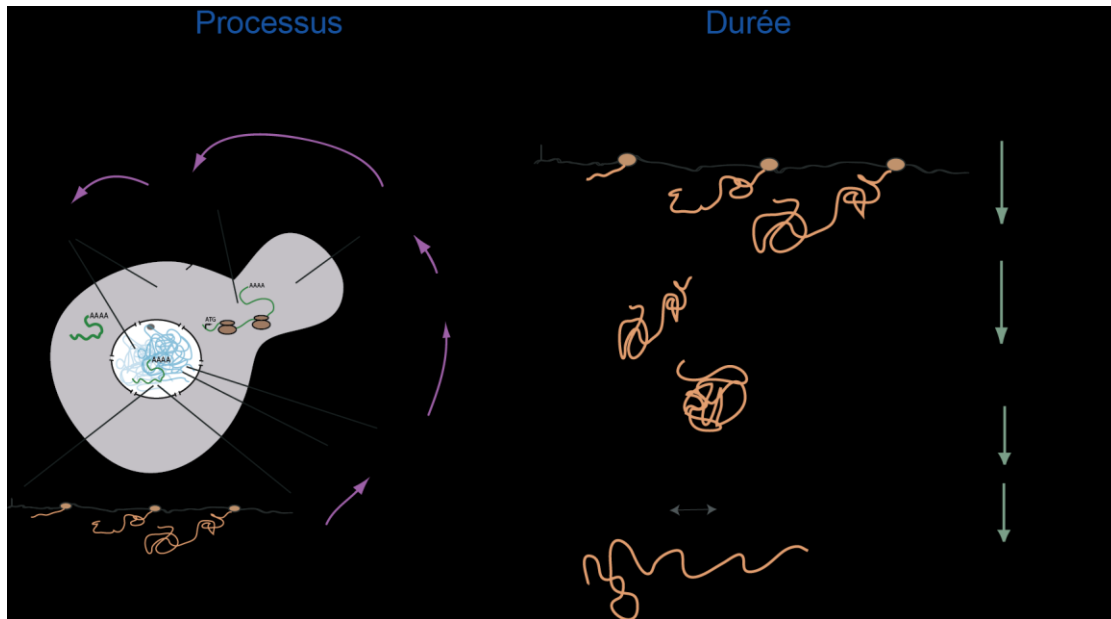
Tandis que les exportines se lient à leurs « cargos » et Ran-GTP dans le noyau. Quand ce complexe arrive au cytoplasme et rencontre RanGAP, le GTP est hydrolysé et le « cargo » est relâché<sup>29</sup>.

## 1.6 Vue d'ensemble de la transcription chez la levure *S. cerevisiae*

Toutefois, le noyau n'est pas uniquement un lieu où des protéines y sont importées ou exportées, c'est le lieu où la transcription de l'ADN se produit. Cela causera la naissance d'un ARNm, qui par la suite, passera à travers plusieurs processus (Figure 1), dont sa maturation et son export vers le cytoplasme. Curieusement, le processus d'export des ARNm est lié étroitement à la transcription (Voir plus bas).

Avant le déclenchement/initiation de la transcription, l'ARN polymérase II (RNA Pol II) et les facteurs généraux de transcription s'assemblent dans le complexe de pré-initiation (PIC) au niveau du promoteur du gène qui se retrouve en amont du site d'initiation de la transcription. Des études ont montrés que le PIC occupe au minimum 60 paires de bases du promoteur et que chaque paire de base est en contact avec l'ARN polymérase II ou avec les facteurs de transcription<sup>30</sup>.

L'ARN polymérase II est formée de 12 sous-unités, les Rpbs (nommées Rpb1 jusqu'à Rpb12)<sup>31</sup>. La partie C-terminale de Rpb1p, la sous-unité la plus large, est appelée CTD. Le CTD est désordonné, joue un rôle dans l'assemblage du PIC et interagit avec Mediator (Mediator est un co-activateur transcriptionnel qui est formé de plusieurs protéines)<sup>32</sup>. De plus, il contient un motif de 7 acides aminés, YSPTSTS<sup>33</sup>, qui sera modifié à plusieurs positions par phosphorylation (Voir plus bas). Il sera phosphorylé à la Serine 2, 5 et/ou 7, et chaque forme modifiée et différente du CTD interagit avec plusieurs protéines, qui serviront de médiateur à différentes étapes du processus de la transcription.



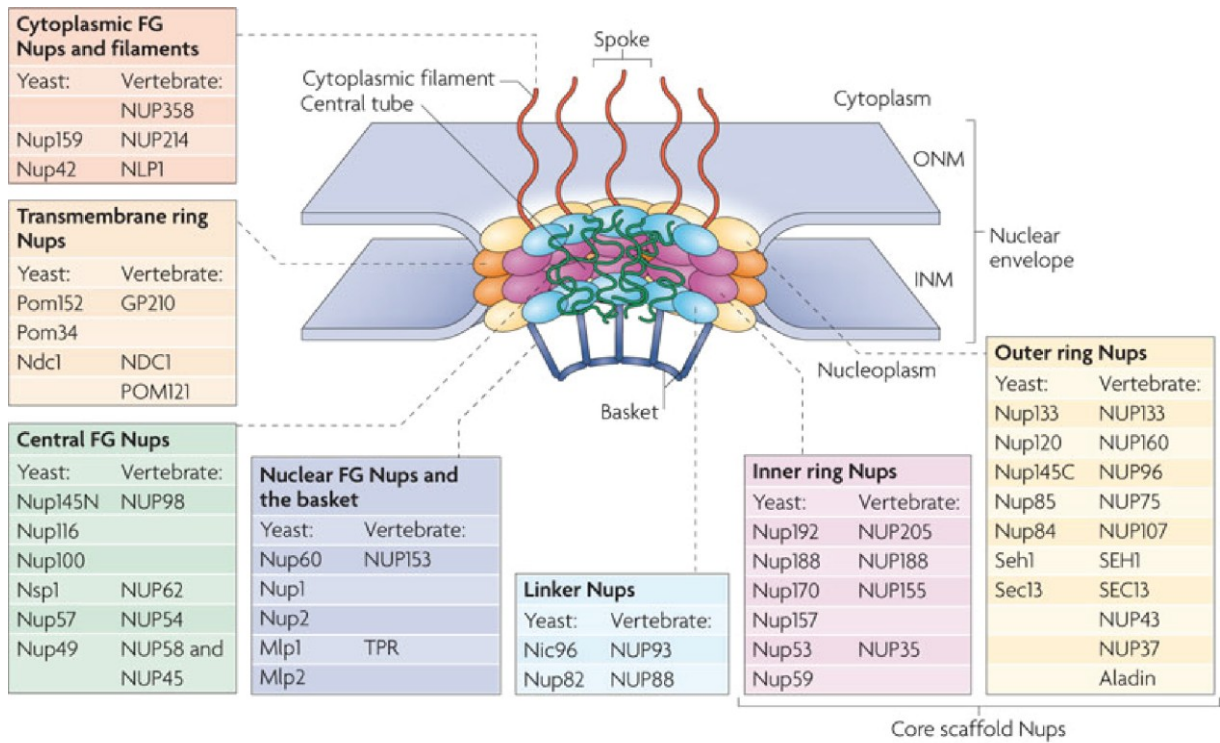
**Figure 1. Le parcours d'un ARNm de la transcription jusqu'à la dégradation.** Illustration montrant les étapes principales que subit un ARNm et la durée que chaque processus prend, depuis la transcription jusqu'à la dégradation.

L'ARN polymérase II ayant son CTD non phosphorylé est assemblée au niveau du PIC, tandis que le CTD doit être phosphorylé à la serine 5 et 7 par une sous-unité de TFIIF (Kin28/Cdk7) pour permettre l'initiation de la transcription<sup>34,35</sup>. Lors de la transition de l'initiation de la transcription à l'élongation, la serine 2 est phosphorylée<sup>33</sup>. Ces différentes modifications par phosphorylation permettent l'association de plusieurs facteurs et complexes protéiques importants à l'ARN polymérase II durant la transcription, comme des remodeleurs de la chromatine, des facteurs de terminaisons de la transcription, facteurs de maturations de l'ARN et facteurs d'export des ARNm (mRNA export factors)<sup>36</sup>.

La dernière phase du processus de transcription est la terminaison et la maturation de la partie 3' de l'ARNm (3'end processing). Ce processus commence lorsque le « cleavage and polyadenylation factor » (CPF) et le « cleavage factor IA » (CFIA) sont recrutées par l'ARN polymérase II durant l'élongation. Quand le CPF reconnaît la séquence AAUAA dans l'ARNm, il induit l'arrêt de la transcription<sup>37</sup>. Ensuite, Rat1p (5'-3' exoribonucléase RNA-trafficking protein 1) est recrutée à la partie 3' du gène via Rtt103 (Regulator of Ty1 transposition 103)<sup>38,39</sup>. Suite au clivage de l'ARNm, Rat1p vient dégrader les restants d'ARN encore liés à l'ARN polymérase II. En dégradant les restants d'ARN, Rat1p rencontre l'ARN polymérase II, ce qui causera le relâchement de cette dernière de l'ADN<sup>40,41</sup>. Finalement, l'ARN clivé sera polyadénylé par la polyadénylate polymérase.

## **1.7 La composition et la structure du pore nucléaire chez la levure *S. cerevisiae***

L'ARNm est produit dans le noyau et ne peut être traduit que dans le cytoplasme. Alors, il doit être exporté vers le cytoplasme en passant à travers l'enveloppe nucléaire via un pore nucléaire (NPC). Ce dernier est hautement conservé chez les eucaryotes. Cependant, lorsque comparé à d'autres eucaryotes, le NPC d'une levure a une plus petite taille. Il est composé de 3 parties : un panier nucléaire, une partie centrale et des filaments cytoplasmiques (Figure 2). Il a une masse de ~50MDa et un diamètre d'environ 100nm. La largeur de sa partie centrale (partie enfoncée dans l'enveloppe nucléaire) est d'environ 40nm<sup>42</sup>.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 2. La structure du pore nucléaire.** Chaque pore nucléaire est formé de protéines appelées Nucléoporines ou Nups. Le pore se retrouve enfoncé dans l'enveloppe nucléaire et connecte le nucléoplasme au cytoplasme. Le pore nucléaire a une structure cylindrique et est formé d'anneau extérieur et intérieur. Au milieu de chaque pore, se trouvent des filaments appelés FG (Phénylalanine-Glycine) Nups. Également, du côté nucléaire du pore se trouve le panier nucléaire et du côté cytoplasmique se trouvent les filaments cytoplasmiques. Figure tirée de l'article «The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation»<sup>25</sup>.



La partie centrale est formée d'un anneau extérieur, un anneau intérieur et un anneau qui entoure la partie centrale, chacune ayant une « eight fold symmetry ». Du côté cytoplasmique, 8 filaments courts (d'environ 50nm) sont projetés de la partie centrale vers le cytoplasme, tandis que du côté nucléaire, le panier nucléaire a une hauteur d'environ 100nm<sup>43,44</sup> (Figure 2).

L'anneau qui entoure la partie centrale est formé d'un ensemble de 3 protéines appelées Pom152p, Pom34p et Ndc1p<sup>45</sup> (Figure 2). Cette dernière joue un rôle dans l'insertion et l'attachement du SPB à l'enveloppe nucléaire<sup>45,46</sup>.

Pom152p et Pom34p sont constituées de parties transmembranaires. Ces 3 protéines sont formées d'hélices alpha, ce qui les aide à attacher le pore et ses composantes à l'enveloppe nucléaire<sup>47,48</sup>. De plus, des études ont montré que ces 3 protéines aident à l'assemblage du pore nucléaire<sup>46,49</sup>.

Tandis que l'anneau intérieur est formé de 6 nucléoporines (Nups) : Nup53p, Nup59p, Nup157p, Nup170p, Nup188p et Nup192p<sup>50</sup> (Figure 2), ces 6 protéines sont importantes pour permettre l'attachement du pore à la membrane nucléaire<sup>50,51</sup>. L'anneau extérieur est formé de 7 Nups (également nommé complexe Nup84) (Figure 2) : Nup84p, Nup85p, Nup120p, Nup133p, Nup145Cp, Seh1p et Sec13p<sup>52,53</sup>. Des études ont montrés que le complexe Nup84p prend une forme de « Y »<sup>53-56</sup>. Les branches du « Y » sont formées de Nup85p-Seh1p et Nup120p et le tronc est formé de Nup133p et Nup145Cp-Sec13p<sup>53,56 (125, 126)</sup>.

Également, une étude menée par Kampmann et Blobel suggère que ce complexe est flexible, reflétant peut-être la flexibilité du noyau durant son assemblage ou durant un changement de forme de l'enveloppe nucléaire<sup>54</sup>. Il faut mentionner que des mutations

impliquant les protéines qui forment le complexe Nup84, causent un défaut dans la distribution des NPC sur l'enveloppe nucléaire. Plus précisément, les pores nucléaires se regroupent (cluster) à un ou plusieurs endroits sur l'enveloppe nucléaire, dépendamment de la sévérité de la mutation<sup>55,57,58</sup>. Cela signifie que ce complexe joue un rôle dans stabilisation de l'attachement du pore à l'enveloppe nucléaire<sup>45</sup>.

Dans le canal central (central channel) du pore nucléaire, plusieurs Nups ayant de multiples répétitions Phénylalanine-Glycine (FG) espacées par ~20 acides aminés polaires y sont retrouvées. Plusieurs études chez la levure *S. cerevisiae* ont montré la présence de 2 types de FG Nups. Le premier type s'appelle FxFG Nups, caractérisé par Nsp1p, ayant quelques acides aminés chargés dans leurs « spacers ». Tandis que le deuxième type s'appelle GLFG Nups, caractérisé par Nup100p, ayant des « spacers » non chargés<sup>59</sup>. De plus, différentes études faites *in vivo* et *in vitro* montrent que les FG Nups forment de longs filaments relâchés (non plié), désordonnés et flexibles<sup>60,61</sup>. De même, ils portent de petits domaines qui leur permettent d'être attachés au pore nucléaire<sup>45</sup> et jouent un rôle actif durant le transport de macromolécules à travers le NPC via leurs interactions hautement spécifiques avec les facteurs de transport (transport factors) d'ARNs et de protéines. Ils forment donc une barrière sélective en excluant le passage de macromolécules qui ne sont pas destinées à être importées dans le noyau, mais en permettant le passage de macromolécules qui le sont.

Comme mentionné ci-haut, 8 filaments courts sont projetés de la partie centrale du pore vers le cytoplasme (Figure 2). Ces filaments sont formés de Nup42p, Nup82p et Nup159p<sup>45,62</sup>. Une étude a montré que Dyn2p, une composante de la dynéine, se lie à Nup159p et renforce les filaments cytoplasmiques<sup>63</sup>. Également, plusieurs études ont montrés

que les filaments cytoplasmiques jouent un rôle dans le relâchement des ARNm dans le cytoplasme<sup>64,65</sup> et permettent l'acheminement des protéines qui doivent être importées dans le noyau<sup>66,67</sup>. Cela signifie que les protéines du pore nucléaire interagissent avec plusieurs composantes importantes de la cellule et lient plusieurs processus cellulaires entre eux.

## 1.8 Comment les ARNm deviennent-ils « matures »?

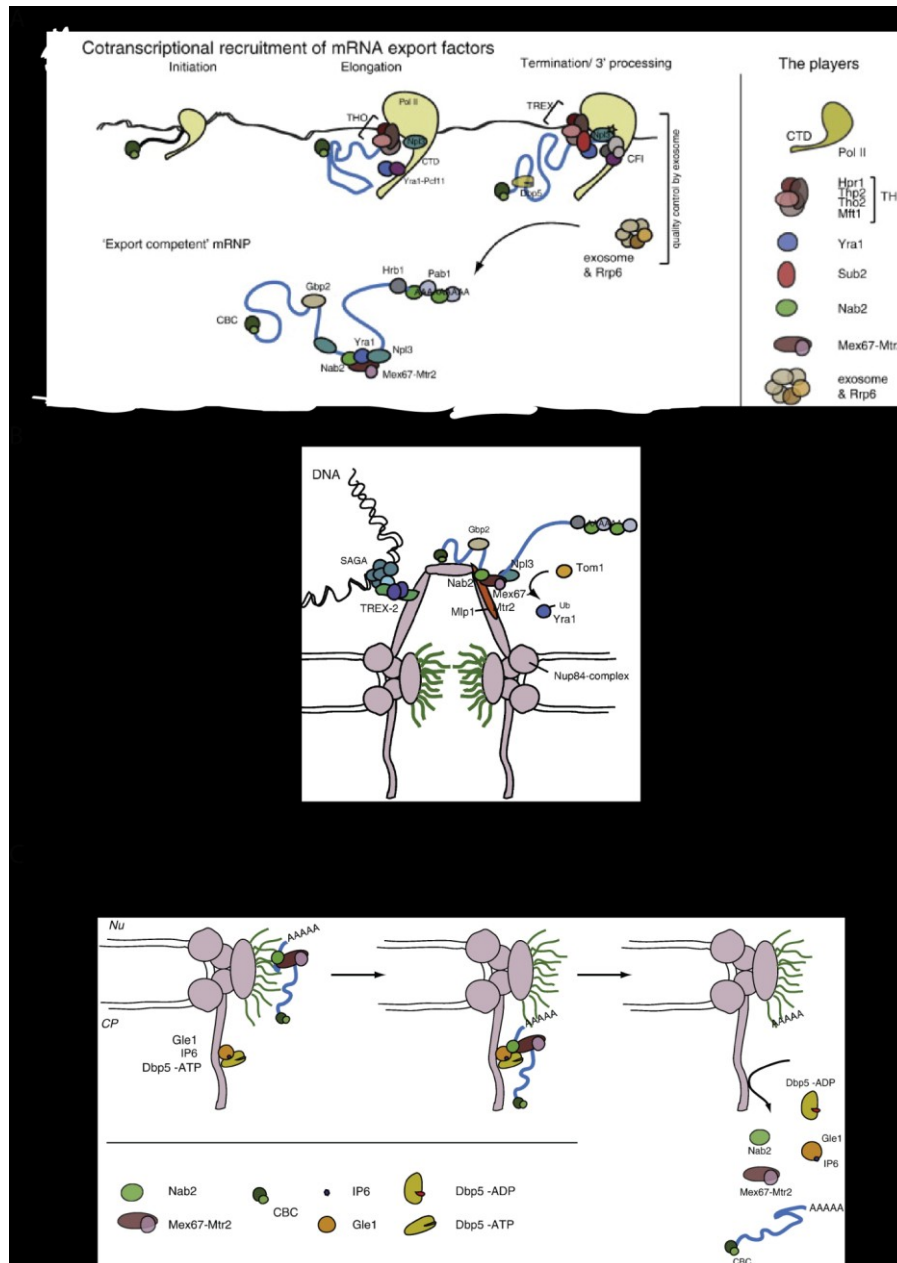
Pour permettre à un ARNm d'être exporté et traduit, il doit subir différentes étapes de maturation. Jusqu'à maintenant, de nombreuses étapes du processus de maturation de l'ARNm restent à découvrir, mais il est connu que la maturation d'un ARNm commence durant la transcription (Figure 3A). La maturation s'amorce lorsque la partie 5' de l'ARNm sera coiffée par le « Cap Binding Complex » (CBC) après la synthèse des ses premiers nucléotides. Ce complexe permet la protection de l'ARNm de la dégradation par des endonucléases dans la cellule<sup>68,69</sup>.

La maturation de l'ARNm dépend aussi de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II, qui permet la coordination de plusieurs événements transcriptionnels. Une étude a montré que Yra1p, un facteur qui permet l'export des ARNm et faisant partie du Transcription Export (TREX) complex (THO, Sub2p, Yra1p, Tex1p)<sup>70</sup>, se lie à la polymérase durant l'élongation via Pcf1 1p, qui lui est lié au CTD phosphorylé à la serine 2<sup>71</sup> (Figure 3A). De plus durant l'élongation, l'ARN sera remodelé et replié (folded). Ce processus impliquerait THO qui est formé de Hpr1p, Tho2p, Mft1p et Thp2p. Cela permettra également la maturation de l'ARNm<sup>72,73</sup>.

Par ailleurs, une étude a montré que Npl3p, une protéine liant l'ARN recrutée à l'ARN polymérase II durant l'élongation, permet le recrutement de Mex67p à l'ARNm suite à sa déphosphorylation (déphosphorylation de Npl3p)<sup>74</sup> (Figure 3A). Mex67p est considérée comme le facteur primaire qui permet l'export des ARNm et interagit directement avec les FG Nups lorsque l'ARNm se retrouve dans la partie centrale du pore (channel)<sup>75-77</sup> (61, 62, 63).

Aussi, un groupe dirigé par Françoise Stutz a montré que Hpr1p, une composante de THO, permet le recrutement de Mex67p à l'ARNm co-transcriptionnellement<sup>19</sup>. Il faut mentionner que la perte de Hpr1p cause des problèmes durant l'élongation, la terminaison de la transcription et dans le processus d'export des ARNm<sup>78-80</sup>.

Finalement, quand la transcription se termine et que l'ARNm est poly-adenylé, Yra1p sera transférée à l'ARNm par Sub2p. De plus, Nab2p sera recrutée à l'ARNm (Figure 3A). Sub2p est une « RNA helicase », recrutée sur l'ARNm durant sa synthèse par THO. Nab2p est une protéine qui contrôle la longueur de la queue polyA, et est aussi un facteur d'export d'ARN<sup>82-84</sup>. Une étude a montré que dans des cellules où THO et Sub2p ont été délétées, l'ARN polymérase II s'arrêtait près de l'extrémité 3' du gène. Cela causait l'inhibition de la poly-adenylation et les ARNm ne pouvaient être relâchés dans le nucléoplasme. Ces résultats suggèrent que Sub2p et THO jouent un rôle dans la coordination de la transcription et l'export des ARNm.



**Figure 3. La formation d'un mRNP, son export et les protéines impliquées.** (A) L'assemblage et la formation d'un ARNm mature et prêt à être exporté commence durant la transcription par le recrutement de facteurs d'export des ARNm (RNA export factors) sur l'ARNm. De plus, le complexe THO se recrute à l'ARN polymérase II pour ne pas permettre à l'ARNm naissant de s'hybrider aléatoirement à l'ADN. Également, Pcf11p se lie à l'ARNm polymérase II et amène Yra1p avec lui, où il sera transféré après à l'ARNm. À la fin, l'ARNm mature sera relâché du site de transcription pour qu'il soit exporté vers le cytoplasme. (B) Figure montrant les différentes interactions nécessaires à l'export des ARNm. L'interaction entre l'ARNm et le NPC dépend de l'interaction entre Mlp1p et Nab2p. Avant l'entrée de l'ARNm dans le milieu du pore, Tom1p ubiquitine Yra1p et cause son relâchement de l'ARNm. (C) Une fois que l'ARNm se trouve au niveau des filaments cytoplasmiques, Dbp5p joue un rôle crucial dans le relâchement de Nab2p et Mex67p de l'ARNm, ce qui permet le relâchement de l'ARNm dans le cytoplasme. Figure tirée de l'article «To the pore and through the pore : A story of mRNA export kinetics»<sup>81</sup>.

## 1.9 Comment les ARNm se comportent-ils une fois dans le noyau?

Une fois que l'ARNm est « mature », relâché dans le nucléoplasme et près à être exporté, comment trouve-t-il son chemin vers un pore nucléaire? Comment va-t-il se comporter dans le nucléoplasme? Plusieurs études faites avec des cellules de mammifères ont montrés que les ARNm dans le noyau se déplacent par diffusion, de la même façon que dans le cytoplasme<sup>85-87</sup>. Cependant, la diffusion ou le mouvement d'un ARNm n'est pas forcément similaire partout dans le nucléoplasme. Si l'ARNm se trouve dans une région dense en chromatine, il va ralentir ou même devenir statique pour un certain moment car il sera plus difficile pour lui de bouger librement dans cet espace<sup>85-87</sup>.

Jusqu'à maintenant, la vitesse exacte à laquelle les ARNm diffusent n'est pas encore connue. Plusieurs études ont essayé de calculer le coefficient de diffusion des ARNm, mais chacune a trouvée une valeur différente<sup>85,87-89</sup>. Ces valeurs varient entre  $0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$  et  $8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Ces différences peuvent s'expliquer par plusieurs raisons. Premièrement l'ARN étudié est différent pour chaque étude et deuxièmement la technique utilisée pour mesurer la diffusion est différente (Single Molecule Tracking ou FRAP). Le single molecule tracking est le suivi du mouvement ou de la trajectoire des particules individuelles, tandis que le FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) permet de détecter la capacité d'une molécule fluorescente à diffuser dans un milieu.

Il est peu probable que la différence (taille, grosseur) de l'ARN étudié cause cet énorme écart, mais plutôt la technique utilisée car recueillir des données précises avec la technique de single molecule tracking repose sur le fait de pouvoir détecter toutes les molécules étudiées. Cela peut causer des problèmes quand les molécules diffusent à des

vitesse variables. Si l'acquisition des images se fait lentement, les molécules les plus rapides ne seront pas détectées. Donc, le coefficient de diffusion calculé sera sous estimé.

De toute façon, le temps nécessaire pour qu'un ARNm atteigne la périphérie du noyau et entrer en contact avec un pore est différent pour chaque ARNm. Ce processus dépend de 3 événements. Premièrement, l'emplacement du gène qui est transcrit. Si le gène est proche de la périphérie nucléaire, l'ARNm va être relâché à côté de la périphérie nucléaire et donc arrivera probablement à la membrane nucléaire (où se trouvent les NPC) plus rapidement. Par contre, si le gène se trouve dans le milieu du nucléoplasme, l'ARNm qui sera relâché doit traverser la moitié du noyau pour arriver à la périphérie (donc forcément, il va prendre plus de temps).

Deuxièmement, le chemin emprunté par l'ARNm pour atteindre la périphérie ainsi que l'endroit où il sera relâché. S'il est relâché dans une région dense en chromatine, nous pensons que l'ARNm diffusera plus lentement (dans cette région) et donc prendra plus de temps pour arriver à la périphérie. Troisièmement, la taille du noyau est aussi importante. Plus le noyau est gros, plus l'ARNm va prendre du temps pour arriver à la périphérie nucléaire et interagir avec un NPC. Toutefois, le noyau d'une levure *S. cerevisiae* est petit comparativement aux autres eucaryotes, nous estimons alors que les ARNm dans un noyau d'une levure, arriveront à la périphérie plus rapidement que les ARNm dans un noyau d'une cellule eucaryotes complexes.

## 1.10 Comment l'ARNm se retrouvera-t-il dans le cytoplasme?

Une fois que le gène est transcrit et que l'ARNm est relâché dans le nucléoplasme, il va arriver à la périphérie, interagir avec le panier nucléaire (Figure 3B), puis il passera à travers le NPC et se retrouvera dans le cytoplasme (Figure 3C). Le mécanisme exact par lequel les ARNm sont transportés vers le cytoplasme n'est pas encore résolu. Mais le premier ARNm qui a été vu passant le pore nucléaire est l'ARNm du « Balbiani Ring », observé à l'aide d'un microscope électronique<sup>90</sup>. Cet ARNm de grande taille se replie pour donner une molécule d'environ 50nm. Quand il arrive à la périphérie et interagit avec le pore nucléaire, cet ARNm se réarrange. Il perd sa forme compactée pour former une structure en ruban, où l'extrémité 5'entre dans le pore en premier.

Mais est-ce que tous les ARNm (bien sûr plus petit que le Balbiani Ring) seront réarrangés pour passer à travers le pore? Une étude récente a montré que les ARNm prennent une structure sphérique avant l'export, mais lorsqu'ils arrivent du côté cytoplasmique du pore, ils se trouvent sous forme « désorganisés »/moins compacte<sup>89</sup>. Curieusement, les ARNm retrouvent leurs structures sphérique et compacte une fois dans le cytoplasme.

En marquant des ARNm par des molécules de YFP (Yellow Fluorescent Protein) en utilisant le système MS2, Grunwald a observé que les ARNm transitent assez rapidement à travers le pore<sup>91</sup>. Il estime qu'entre 5ms et 20 ms sont nécessaires pour qu'un ARNm passe le milieu du pore (channel) durant la translocation et que 80ms sont nécessaires pour traverser le panier nucléaire. Lorsqu'il se trouve du côté cytoplasmique du pore, l'ARNm est ensuite relargué dans le cytoplasme en 80ms . Il faut mentionner qu'une fois dans le milieu du pore



(channel), l'ARNm ne transit pas uni-directionnellement. Il peut bouger dans les 2 directions et peut aussi retourner dans le noyau<sup>92</sup>.

Suite à la translocation de l'ARNm via le canal central du pore (central channel), l'ARNm doit être relâché maintenant dans le cytoplasme (Figure 3C). La protéine Dbp5p joue un rôle important dans ce processus<sup>93-95</sup>. Cette dernière est une « DEAD-box RNA helicase » qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme et permet le relâchement de l'ARNm dans le cytoplasme lorsque ce dernier arrive du côté cytoplasmique du pore<sup>96</sup> (Figure 3C).

Les études ont montré que lorsque l'ARNm arrive du côté cytoplasmique du pore, Dbp5p qui se trouve déjà sur l'ARNm, se lie à Gle1p et son cofacteur IP6. Cela active la fonction ATPase de Dbp5p et cause un changement de conformation de la protéine, qui permet la dissociation de Mex67p et Nab2p de l'ARNm (Figure 3C). Ceci cause le relâchement de l'ARNm dans le cytoplasme. Également, une étude a montrée que Dbp5p n'interagit pas directement avec Nab2p, mais l'hydrolyse de l'ATP cause la restructuration de l'ARNm et inhibe la liaison de Nab2p à l'ARNm<sup>97</sup>. Pour être capable de remodeler l'ARNm et hydrolyser l'ATP de nouveau, Dbp5p se lie à Nup159p (Nup159p est une nucléoporine se trouvant du côté cytoplasmique du pore). Cette liaison entre Nup159p et Dbp5p survient après que Dbp5p ait relâché l'ARNm dans le cytoplasme car Dbp5p ne peut pas lier Nup159p et l'ARNm en même temps<sup>64,65</sup>.

Autre que Dbp5p, il a été suggéré que Nup42p et Gfd1p jouent un rôle dans le relâchement de l'ARNm dans le cytoplasme lorsque ce dernier arrive du côté cytoplasmique du pore nucléaire. Dans le cas de Nup42p, elle interagit directement avec Gle1p et permet son ancrage au niveau du pore<sup>98</sup>. De plus, Nup42p est requis pour permettre l'export des ARNm

de gènes activés lors d'un « heat shock » spécifiquement<sup>99</sup>. Tandis que Gfd1p se trouve en complexe avec Gle1p et interagit directement avec Nab2p<sup>100</sup>.

### 1.11 Quelles sont les protéines qui forment le panier nucléaire?

Une fois à la périphérie nucléaire, la première structure que les ARNm retrouveront en route vers le cytoplasme, est le panier nucléaire. La composition exacte du panier nucléaire n'est pas encore connue, mais le premier constituant a été identifié durant l'année 1993, quand Kölling et al étudiaient le rôle des myosines chez la levure *S. cerevisiae*<sup>101</sup>. Le gène *MYO1* venait d'être caractérisé<sup>102</sup>, mais des données biochimiques suggéraient la présence d'autres protéines similaires à la myosine chez la levure<sup>103</sup>.

Alors ce groupe a tenté de trouver ces protéines là à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé vers la chaîne lourde de la myosine humaine. Cet anticorps a été utilisé pour cribler la librairie d'ADN génomique de la levure. Une nouvelle protéine a réagit avec l'anticorps. À l'aide de sa séquence, ils ont pu retracer le gène qui a été appelé *MLP1* pour Myosin Like Protein 1. Ce gène a été séquencé et son « Open Reading Frame » (ORF) code pour une protéine de 218 kDa. Ensuite, ils ont remplacés une partie du gène *MLP1* par le gène *LEU2*. Donc la cellule n'exprime plus toute la protéine et cela n'a eu aucun effet sur sa survie, ce qui veut dire que Mlp1p n'est pas essentielle à la survie de la cellule<sup>101</sup>.

Également, en analysant le génome de la levure, un groupe dirigé par Rout a trouvé un autre gène ayant une séquence similaire à *MLP1* et on appelé ce gène *MLP2*<sup>104</sup>.

## **1.12 Mlp1p peut former des structures en spirales et des domaines globulaires**

En analysant la séquence d'ADN de *MLP1*, Kölling et al ont trouvés plusieurs séquences similaires à la myosine et aux filaments intermédiaires. Comme la myosine et les filaments intermédiaires ont des domaines qui peuvent former des structures en spirales (Coiled-coil structures), les chercheurs ont voulu savoir si Mlp1p peut former ces structures. L'analyse de la séquence de *MLP1* montre la présence de 2 régions tout de suite après la partie N-terminale qui contiennent des « heptad repeats » (qui permettent la formation de structures en spirales), tandis que la partie C-terminale de la protéine est formée d'un domaine globulaire<sup>101</sup>.

Également, le groupe dirigé par Rout a trouvé que Mlp1p et Mlp2p sont similaires à la protéine Tpr, qui se trouve au niveau de l'enveloppe nucléaire des vertébrés et de la drosophile melanogaster<sup>105-108</sup>. La différence principale entre Tpr et Mlp1p est que la queue C-terminale de Tpr est plus longue et a un caractère plus acide.

## **1.13 Mlp1p et Mlp2p se trouvent du côté nucléaire du noyau**

À l'aide de la technique d'immunofluorescence et en utilisant un anticorps anti-Mlp1p, Kölling et al ont voulu étudier la localisation de Mlp1p. Ils ont trouvés que la protéine se trouve adjacente au noyau<sup>101</sup>. De plus, elle prend la forme d'un anneau avec la présence de foci plus lumineux<sup>101</sup>.

Pour mieux comprendre la localisation de Mlp1p et Mlp2p, Strambio-de-castilla et al ont isolés des noyaux de levure et ces 2 protéines ont été marquées à l'aide d'anticorps anti-Mlp1p et anti-Mlp2p<sup>104</sup>. Les chercheurs ont trouvés que ces 2 protéines se retrouvent sur le versant nucléoplasmique de la membrane nucléaire et qu'elles s'étendent environ 120nm de l'enveloppe nucléaire. De plus, ils ont suggéré que Mlp1p et Mlp2p sont associées à des filaments localisés entre le pore et l'intérieur du noyau<sup>104</sup>.

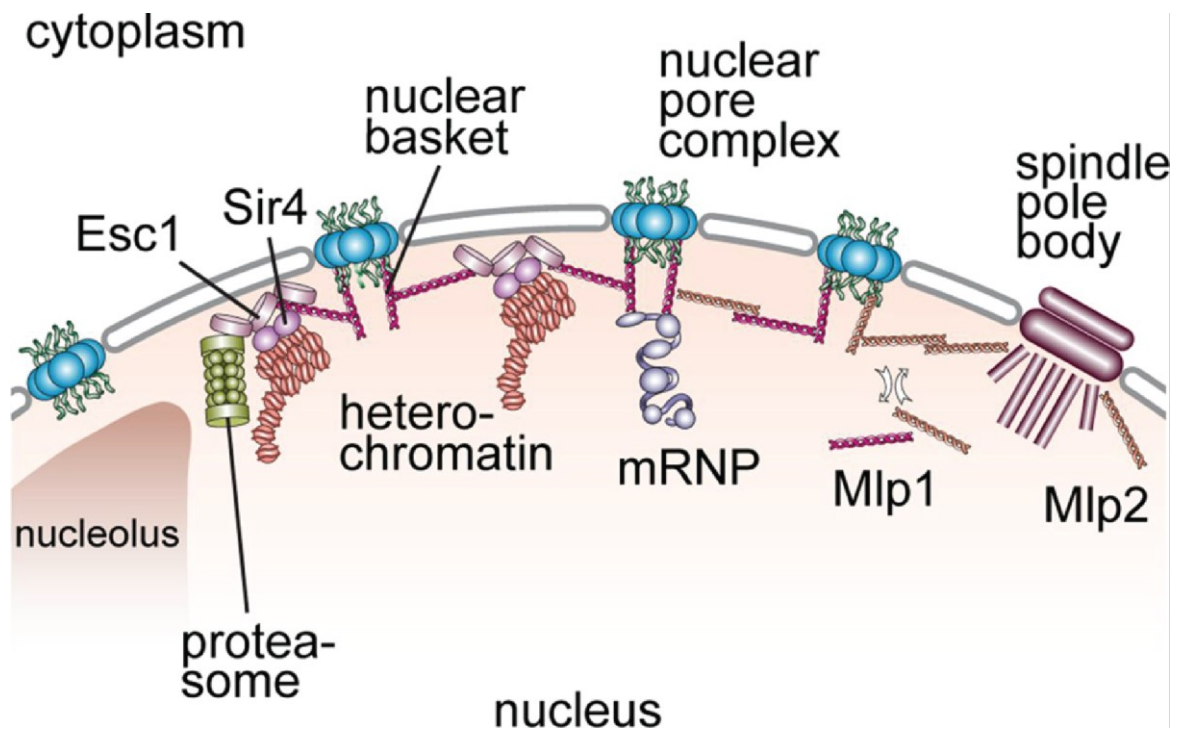
En divisant Mlp1p en 3 parties (N-terminale, milieu et C-terminale) et en marquant chaque partie avec une molécule de GFP, le même groupe a trouvé que seulement la partie C-terminale de Mlp1p-GFP se retrouve dans le noyau, tandis que les autres parties se retrouvent dans le cytoplasme<sup>104</sup>. Cela signifie que la partie C-terminale de Mlp1p contient un NLS. Kosova et al ont constaté la même chose pour Mlp2p<sup>109</sup>.

Dans une étude récemment publiée, les parties N-terminale et C-terminale de Mlp1p et Mlp2p ont été marquées par la protéine A<sup>110</sup>. En utilisant la technique Immuno Electron Microscopy (IEM), les chercheurs ont trouvés que les partie N-terminale et C-terminale de Mlp1p et Mlp2p se retrouvent à 60 nm du pore. Ils suggèrent donc que les Mlps sont attachées au pore par une conformation d'épingle à cheveux (hairpin like conformation) (Figure 4). Curieusement, la même chose a été suggérée pour la protéine Tpr<sup>111</sup>. Comme les Mlps ne se trouvent pas exclusivement au niveau du pore<sup>104</sup>, ils ont estimés la position des parties N et C terminale des Mlps par rapport à l'enveloppe nucléaire (où il n'y a pas de pore). Celles-ci ont été retrouvées à environ 30nm-40nm de l'enveloppe nucléaire. Cela suggère que les Mlps qui ne sont pas associées avec le pore, forment une structure horizontale et parallèle à l'enveloppe nucléaire (Figure 4).

Curieusement, en utilisant une nouvelle technique où les noyaux de levures sont rapidement isolés et visualisés à l'aide d'un microscope électronique, ces mêmes chercheurs n'ont pu déceler la présence du panier nucléaire dans des cellules où les Mlps ont été délétées, contrairement aux cellules sauvages<sup>110</sup>. Cela suggère que le panier nucléaire est formé de Mlps et/ou les Mlps permettent la formation du panier nucléaire. Également, ils ont observés que les environs du pore nucléaire sont plus denses en chromatine lorsque les Mlps sont délétées<sup>110</sup>. Cela suggère que les Mlps ou le panier nucléaire permet de dégager la région aux alentours du pore.

Comme la partie C-terminale de Mlp1p ne permet pas son attachement au pore, ce même groupe a divisé la partie N-terminale de Mlp1p en plusieurs parties, et ont marqué chacune de ces parties par une molécule de GFP<sup>110</sup>. Ils ont trouvés que seulement la partie qui contient les acides aminés 338 jusqu'à 616 donnent un signal qui co-localise avec le signal du pore nucléaire. Donc c'est cette partie de la protéine Mlp1p qui permet son attachement au pore.

Curieusement, Carmody et al ont montré que lors d'un stress par choc thermique (heat shock), Mlp1p ne se trouve plus au niveau de l'enveloppe nucléaire, mais se retrouve dans un foci nucléaire avec Nab2p et Yra1p, mais pas Mex67p<sup>112</sup>. Cela suggère que la présence du panier nucléaire au niveau du pore peut être régulée. Cependant, rien n'est connu à propos de cette régulation.



**Figure 4. Les Mlps forment le panier nucléaire.** Mlp1p et Mlp2p forment le panier nucléaire qui est un point d'arrimage des mRNP, organise la chromatine et permet l'ancrage du SPB. Également, ils interconnectent les pores entre eux et donne de la rigidité à l'enveloppe nucléaire. Figure tirée de l'article «The nuclear basket proteins Mlp1p and Mlp2p are part of a dynamic interactome including Esc1p and the proteasome»<sup>110</sup>.

## 1.14 Les Mlps interagissent avec les nucléoporines et les facteurs d'export des ARNm

En voulant apprendre plus sur les protéines attachées à l'enveloppe nucléaire mais qui ne sont pas des nucléoporines, Strambio-de-Castillia et al ont étudiés plus en détails la protéine Mlp1p<sup>104</sup>. Une mutation ou une délétion des gènes qui codent pour certaines Nups, comme le gène *NUP133*, cause l'accumulation et le rassemblement (clustering) de tout les pores nucléaires à un côté de l'enveloppe nucléaire. Alors ces chercheurs ont fait l'hypothèse que dans une souche où *NUP133* est muté ou délété, les protéines qui sont associées partiellement ou qui ne sont pas en contact étroit avec les pores ne vont pas se rassembler ou vont s'accumuler partiellement au même endroit que les NPC. Ainsi en utilisant la technique d'immunofluorescence et en utilisant des anticorps anti-Nup159p et anti-Mlp1p, ils ont trouvés que Mlp1p co-localise avec les pores nucléaires, donc forcément avec l'enveloppe nucléaire dans une souche sauvage (wild-type)<sup>104</sup>. Mais dans le cas d'une souche  $\Delta nup133$ , Mlp1p co-localise avec les NPC et se retrouve aussi à la périphérie où il n'y a pas de pores. Cela veut dire que cette protéine est associée partiellement et/ou n'est pas en contact étroit avec le pore.

Également, Kosova et al ont retrouvés Mlp2p en purifiant Nic96p, qui est une protéine se trouvant du coté nucléaire du NPC<sup>109</sup>. Puis en marquant Mlp2p par GFP, ce groupe a trouvée Mlp2p au niveau du pore nucléaire comme Mlp1p dans une souche sauvage et dans une souche  $\Delta nup133$ , Mlp2p co-localise aussi avec le pore nucléaire.

Récemment, le groupe Niepel et al ont montrés que les Mlps interagissent avec plusieurs protéines<sup>110</sup>. Après avoir purifié Mlp1p et Mlp2p, et en concordance avec d'autres études, ce groupe les a trouvées en association avec Nup84p, Nup1p et Nup60p<sup>113-116</sup>. De plus, suite à la délétion de *NUP60*, *NUP1* et *NUP84* séparément, Mlp1p ne se retrouve plus attaché à la périphérie.

Également, Mlp1p a été trouvée associée à des protéines en lien avec la transcription et l'export des ARNm, comme Yra1p, Mex67p, Sac3p, Thp1p, Cdc31p. Yra1p est une protéine qui permet l'export des ARNm (RNA export factor) et se lie à l'ARNm durant la transcription<sup>117,118</sup>. Toutefois, Mlp2p a été trouvée associée à Mex67p seulement. Comme Mex67p a une faible affinité aux ARNm, elle est recrutée à ces derniers via plusieurs adaptateurs comme le complexe THO-TREX, Yra1p et Npl3p<sup>70,119,120</sup>. Aussi en purifiant Mlp1p et en concordance avec d'autres études, ce groupe retrouve Mlp2p et en purifiant Mlp2p retrouve Mlp1p, ce qui indique que ces 2 protéines interagissent ensemble ou se retrouvent dans le même complexe<sup>121,122</sup>. Toutes ces observations nous indiquent que les Mlps sont reliées aux composants/protéines qui se trouvent du côté nucléaire du NPC et interagissent avec plusieurs protéines nucléaires.

Autres que les protéines reliées à la transcription et l'export, ce même groupe a découvert que Mlp1p et Mlp2p interagissent avec Esc1p (Figure 4). Cette protéine se trouve à la périphérie nucléaire et co-localise exactement avec celui de Mlp1p (en forme de croissant). Elle est impliquée dans l'inactivation transcriptionnelle des télomères, l'organisation de la structure de l'enveloppe nucléaire, la correction des défauts dans l'ARNm (« proofreading » de l'ARNm) et la réparation de l'ADN<sup>116,123-127</sup>.



## 1.15 Mlp1p interagit directement avec Nab2p

Niepel et al ont détectés les interactions entre Mlp1p, Mlp2p et les autres protéines en utilisant la technique d'immunoprécipitation (pull-outs). Un désavantage de la méthode d'immunoprécipitation est que lorsque l'on extrait Mlp1p, l'ensemble du pore nucléaire est purifié avec celle-ci. Alors si on trouve Mex67p et Yra1p suite à une immunoprécipitation de Mlp1p, cela ne veut pas forcément dire que Mlp1p et Mex67p ou Yra1p interagissent directement, mais peut-être que Mlp1p et Mex67p ou Yra1p font partie d'un complexe. La question qui se pose alors est : Est ce qu'il y a au moins une protéine qui interagit directement avec Mlp1p ou Mlp2p?

En utilisant la technique de double hybride (yeast two hybrid), qui permet de savoir si 2 protéines interagissent ensemble, Green et al ont montrés que la partie C-terminale de Mlp1p interagit directement avec la protéine Nab2p<sup>128</sup>. Nab2p est une « polyadenylated RNA-binding protein » requise pour l'export des ARNm, mais aussi pour la régulation de la polyadenylation. Également, elle contrôle la maturation de la partie 3' de l'ARNm<sup>82-84,129,130</sup>. En outre, elle est une protéine nucléaire qui se lie à l'ARNm pendant ou tout de suite après la poly-adénylation<sup>129,131,132</sup>. Elle reste attachée à l'ARNm durant son passage à travers le pore et est enlevée de l'ARNm lorsqu'il arrive du côté cytoplasmique du pore<sup>97</sup>.

De plus, ce groupe a étudié plus en détails l'interaction entre Nab2p et Mlp1p<sup>133</sup>. En disséquant la partie C-terminale de Mlp1p en plusieurs parties distinctes, ils ont remarqués que les résidus 1586 à 1779 (de Mlp1p) sont responsables de cette liaison. Finalement, en mutant l'acide aminé phénylalanine 73 de Nab2p en acide aspartique, ils ont remarqué que la

liaison entre Mlp1p et Nab2p a été perdue. De plus, ils se sont aperçus que cela affectait l'export des ARN.

## 1.16 Les Mlps jouent un rôle dans l'organisation nucléaire

Connaissant la plupart des protéines qui interagissent avec Mlp1p et Mlp2p, leurs localisations et leurs structures (localisation et structure de Mlp1p et Mlp2p), une question principale qui reste sans réponses : à quoi servent ces protéines? Une des réponses est venue du groupe dirigé par Nehrbass<sup>134</sup>. Ils ont découvert que les Mlps sont responsables de l'organisation fonctionnelle et structurale de la chromatine perinucléaire. Plus précisément, la perte de Mlp2p cause une carence sévère dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Également, la perte de Mlp1p et Mlp2p perturbe le regroupement des télomères à la périphérie nucléaire et stoppe la répression de la transcription des gènes télomériques. Les protéines impliquées dans la localisation des télomères à la périphérie sont Yku70/Yku80 ainsi que Sir4<sup>135</sup>. Ces protéines peuvent se lier aux télomères, jouer un rôle dans la réparation des cassures double brin et l'entretien des télomères<sup>136-143</sup>.

Ce groupe a dévoilé que Mlp2p permet l'attachement de Yku70p à la périphérie, ce qui permet de créer un lien entre le pore et la chromatine. Alors ils proposent que via ces interactions, le pore nucléaire permet l'organisation de sous-domaines au niveau de la périphérie qui permettent la régulation du métabolisme de la chromatine. Pourtant un groupe dirigé par Gasser remarque que la perte de Mlp1p et Mlp2p ne perturbe pas le regroupement des télomères à la périphérie, mais cela cause la présence de télomères plus long que la normal<sup>144</sup>.

De plus, Niepel et al ont découverts un rôle de Mlp2p dans l'organisation de l'enveloppe nucléaire et des chromosomes<sup>121</sup>. Ils ont remarqués que Mlp2p interagit directement avec les protéines Spc110p, Spc42p et Spc29p qui sont des composantes du SPB. Également, ils ont montré que le fonctionnement normal du SPB est compromis lors de la perte de Mlp2p. Plus précisément, la perte de Mlp2p cause la formation d'un plus petit SPB et donc un échec dans la division cellulaire. Aussi ce même groupe a suggéré que les Mlps permettent le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, car dans des cellules où les Mlps ont été délétées, la forme du noyau n'est plus lisse et régulière comme dans le cas des cellules sauvages<sup>110</sup>.

### **1.17 Les Mlps jouent un rôle dans le contrôle de qualité des ARNm**

Autres qu'un effet sur les télomères, Galy et al suggèrent un rôle de Mlp1p dans le contrôle de qualité des ARNm<sup>114</sup>. Ils ont remarqués qu'en perdant Mlp1p, plus d'ARNm contenant des introns se retrouvent dans le cytoplasme. Cela arrive sans affecter l'épissage des ARNm. Mais malheureusement, ils n'ont pas examinés si Mlp1p joue un rôle de contrôle de qualité ou si c'est des protéines attachées à Mlp1p qui permettent étapes de contrôle de qualité de l'ARNm.

Par ailleurs, Palancade et al ont découvert la protéine Pml39p qui est liée à Mlp1p et Mlp2p. La perte de Pml39p, aussi cause une augmentation d'ARNm non épissés dans le cytoplasme<sup>122</sup>. En plus, la surexpression de cette protéine cause l'emprisonnement d'ARNm contenant des introns, de même que Nab2p dans le noyau. Finalement, ils ont montrés que la perte de Nup60p (donc Mlp1p ne se retrouve plus au niveau du pore) permet le détachement de Pml39p de la périphérie. Ces résultats suggèrent que Pml39p interagit avec Mlp1p.

Récemment, Hackmann et al montrent que 2 Serine/Arginine (SR)-protéines, Gbp2p et Hrb1p, ont un rôle dans la rétention des ARNm contenant un intron dans le noyau<sup>145</sup>. Ce sont des protéines liant l'ARN, recrutées à l'ARNm de manière co-transcriptionnelle, et qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme quand elles sont liées aux ARNm matures<sup>146,147</sup>. Ils ont trouvé que ces 2 protéines peuvent se lier à Mlp1p de manière indépendante de l'ARNm. Également, ils ont montré que la perte de ces 2 protéines cause la présence de plus d'ARNm non épissé dans le cytoplasme que suite à une délétion de *MLP1*.

### **1.18 Est-ce que les Mlps jouent un rôle durant le processus d'export des ARNm?**

Un autre rôle des Mlps est la régulation de l'expression des gènes au niveau de l'export des ARNm<sup>148</sup>. Vinciguerra et al ont montrés que les mutants de Yra1p causent des défauts dans l'export des ARNm. Plus précisément, les Mlps diminuent la synthèse d'ARNm de leur gène rapporteur *lacZ* dans les mutants de Yra1p et la perte des Mlps permet le retour à la normal du nombre de transcrits de leur rapporteur. Finalement, ils montrent que Yra1p interagit directement avec Nab2p et que la perte des Mlps permet le sauvetage (rescue) du défaut de croissance dans les mutants de Yra1p et Nab2p.

Étonnamment, Kosova et al ont remarqués que la surexpression de Mlp1p seulement ou Mlp1p et Mlp2p en non Mlp2p seulement, permet une accumulation d'ARN polyA dans le noyau<sup>109</sup>. Cela suggère que Mlp1p peut être impliquée dans l'export des ARNm ou au moins interagit avec des protéines impliquées dans l'export des ARNm.

Mais est ce que la surexpression de toute la protéine Mlp1p est nécessaire pour causer l'accumulation d'ARNm dans le noyau? Green et al ont trouvé que la surexpression de la partie C-terminale seulement, cause l'accumulation d'ARN dans le noyau<sup>129</sup>. Cela veut dire que la partie C-terminale et probablement sont interaction avec Nab2p sont responsables de ce phénotype. Parce que l'accumulation d'ARNm dans le noyau (suite à la surexpression de Mlp1p) cause l'arrêt de la croissance cellulaire, il est étonnant de constater que la perte de *MLP1* ne cause pas un défaut de croissance.

Afin de mieux caractériser le rôle de l'interaction entre Mlp1p et Nab2p dans le processus d'export des ARNm, ils ont testé si la surexpression de Mlp1p ne permet plus à Nab2p de sortir du noyau<sup>129</sup>. Comme mentionné ci-haut, Nab2p est une protéine qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (shuttling factor). Alors ils ont altéré la protéine pour qu'elle ai une forme plus cytoplasmique que nucléaire (mais elle peut toujours aller au noyau), en délétant le domaine RGG de Nab2p. Ce domaine lie le « import receptor » de Nab2p. Suite à la surexpression de Mlp1p, ils se sont aperçus que Nab2p s'accumulait dans le noyau ce qui veut dire que la partie C-terminale de Mlp1p bloque l'export de Nab2p vers le cytoplasme<sup>129</sup>.

En disséquant la partie C-terminale en plusieurs parties distinctes, ils ont remarqués que les résidus 1586 à 1779 de Mlp1p sont responsables de cette liaison et sa surexpression cause l'accumulation d'ARN dans le noyau. Étonnamment, la surexpression de ces résidus cause l'accumulation de moins d'ARNm dans le noyau que lorsque toute la partie C-terminale de Mlp1p est surexprimée<sup>133</sup>.

## 1.19 Transcription à la périphérie et le rôle des Mlps dans ce processus

Comme mentionné ci-haut, plusieurs études ont montré que le pore nucléaire (précisément le panier nucléaire), permet la répression de la transcription des gènes télomériques et que le panier peut se lier à la chromatine (Figure 4). En voulant caractériser plus en détails l'interaction entre les gènes et le pore nucléaire, Dieppo et al montrent que Mlp1p et Mex67p contribuent à l'ancrage des gènes inductibles *HSP104* et *GAL10* à la périphérie du noyau et que cette association corrèle avec le recrutement cotranscriptionnel de Mex67p par ces derniers, tout cela d'une manière indépendante de l'ARN<sup>19</sup>. Aussi les gènes *INO1* et *HXK1* se retrouvent à la périphérie suite à leur activation<sup>149-151</sup>. La manière dont ces gènes s'attachent à la périphérie est inconnue pour le moment. Mais une des hypothèses vient du fait que chez la levure le noyau est petit, la chromatine est mobile et la plupart des locus diffusent dans un volume d'environ  $0.5\mu\text{m}^{16,152}$ . Donc, n'importe quel gène peut entrer en contact avec la périphérie nucléaire. La grande majorité des gènes qui se retrouvent attachés à la périphérie sont fortement transcrits, mais il est difficile de dire si une forte transcription est un pré-requis à l'attachement des gènes à la périphérie ou l'attachement cause cette forte transcription.

Autre que Mlp1p et Mex67p, SAGA (un co-activateur transcriptionnel) et TREX-2 ont été impliqués dans le recrutement des gènes à la périphérie<sup>153,154</sup>. Mais seulement 10% des gènes chez la levure *S. cerevisiae* sont régulés par SAGA ce qui suggère que seulement une partie des gènes de la levure peuvent se retrouver attachés à la périphérie<sup>155,156</sup>.

Étonnamment, Luthra et al ont montré un lien entre SAGA et les Mlps<sup>157</sup>. Ils ont montrés que la partie C-terminale de Mlp1 interagit directement avec les protéines du

complexes SAGA. Également, ils ont trouvés que Mlp1p et SAGA lient directement les promoteurs des gènes GAL (*GAL1*, *GAL7*, *GAL10*) via la technique de ChIP.

Comme le gène *GAL1* peut se retrouver attaché à un pore nucléaire lorsqu'il est transcrit, un groupe mené par Nehrbass a montré que suite à l'ajout de galactose (donc l'induction de la transcription du gène *GAL1*), le gène *GAL1* va se retrouver à la périphérie nucléaire 71% des fois, tandis que ce pourcentage va chuter à 43% lorsque ce gène n'est pas actif (en présence de glucose)<sup>150</sup>. *GAL1* est un des 10% des gènes qui sont régulés par SAGA, mais quelles sont les protéines qui permettent son attachement à la périphérie nucléaire suite à son activation? Le même groupe a trouvé qu'en délétant *ADA2*, *SUS1* (des composantes de SAGA) et *NUPI1*, le pourcentage de *GAL1* actif (en présence de galactose) à la périphérie nucléaire a chuté jusqu'à 50% (semblable au pourcentage de *GAL1* à la périphérie en présence de glucose). Ada2p et Sus1p font partie du complexe SAGA et Nup1p est une composante du pore nucléaire, ce qui montre que SAGA et le pore nucléaire sont importants pour le maintien du gène *GAL1* à la périphérie.

## 1.20 Le phénomène du « gene gating »

Sachant tout cela, une façon d'emmener l'ARNm vers le cytoplasme a été suggérée il y a déjà 30 ans par Günter Blobel en 1985<sup>158</sup>. Comme mentionné avant, certains gènes transcriptionnellement actifs peuvent interagir directement avec des pores nucléaires. Alors, Blobel émet une hypothèse où tout les ARNm naissant venant d'un gène qui est transcrit et lié à un pore nucléaire, vont sortir directement vers le cytoplasme via ce pore.

Récemment, Casolari et al, en utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), en ayant différentes Nups comme « bait », ont remarqués que plusieurs gènes transcriptionnellement actifs interagissent directement avec les Nups<sup>159</sup>. La majorité de ces derniers sont des protéines qui forment le panier nucléaire. Cela suggère que les gènes se lient à un pore peut-être pour permettre un export plus rapide des ARNm.

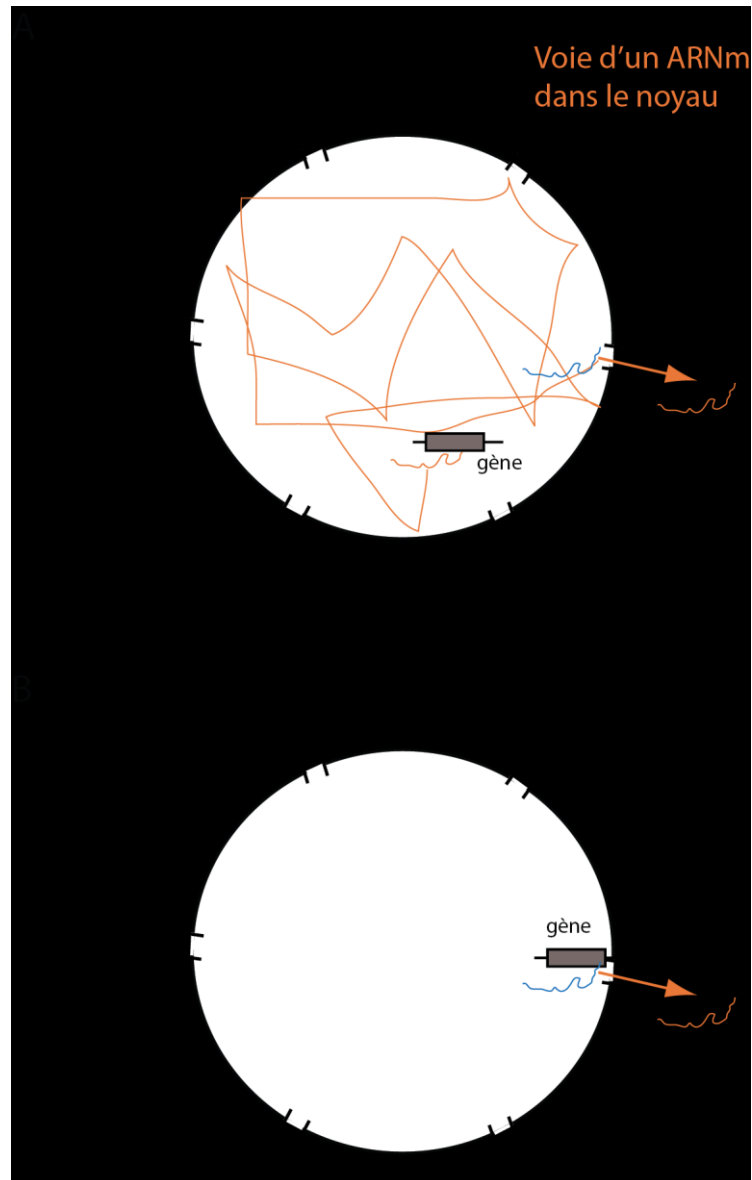
Ce n'est pas connu si le phénomène du « gene gating » est courant chez les eucaryotes plus complexes. Chez la drosophile, TREX-2 est conservé et requis pour l'export des ARNm et l'attachement de quelques gènes à la périphérie<sup>160,161</sup>. Mais chez les eucaryotes plus complexes, la grande majorité des gènes ne sont pas transcrits à la périphérie et suite à leur activation, les gènes se déplacent vers le milieu du noyau<sup>18,162</sup>. Donc quel est l'avantage du « gene gating » est une question qui reste sans réponse pour le moment.

## **1.21 Quels sont les objectifs de notre projet de recherche?**

Une régulation adéquate de l'expression des gènes est importante pour la survie normale de la cellule. Une des étapes le long de la voie de l'expression des gènes est l'export des ARNm vers le cytoplasme. Cependant, cette étape reflète une courte période de temps de la vie d'un ARNm (Figure 1).

Sachant tout cela, nous sommes intéressés à savoir comment un ARNm est exporté du noyau vers le cytoplasme. Plus précisément, comment un ARNm va se comporter dans le noyau et comment va-t-il être capable de trouver son chemin vers la périphérie du noyau où il sera en contact avec un pore nucléaire (Figure 5A). Également, nous voulons savoir si chaque contact entre le pore nucléaire et l'ARNm va mener à l'export de ce dernier.





**Figure 5. Différents modèles pour l'export de l'ARNm.** (A) Illustration montrant une voie possible d'un ARNm dans le noyau après avoir été relâché du site de transcription, avant de trouver un pore nucléaire libre et sortir vers le cytoplasme. (B) Illustration montrant une hypothèse suggérée par Blobel<sup>158</sup>, que l'on testera, où un gène transcrit à la périphérie et attaché à un pore, verra son ARNm être exporté directement via ce même pore.

Comme mentionné ci-haut, Mlp1p et Mlp2p (donc le panier nucléaire) jouent plusieurs rôles dans différents processus cellulaires, dont le maintien d'ARNm non-épissé dans le noyau. Par conséquent, nous avons voulu savoir si les Mlps/Panier nucléaire jouent un rôle (par exemple : contrôle de qualité) dans le processus d'export des ARNm. De plus, nous avons voulu savoir l'effet qu'ont les facteurs d'export des ARNm (mRNA export factors) sur le comportement des ARNm à la périphérie nucléaire.

Puisque le groupe dirigé par Nehrbass a montré que le gène *GALI* se retrouve à la périphérie (attaché à un pore nucléaire) durant sa transcription<sup>150</sup> et suite à l'hypothèse émise par Blobel, où il suggère qu'un gène transcrit à la périphérie verra son ARNm être exporté via ce même pore<sup>158</sup>, nous avons voulu savoir si la transcription à la périphérie, à un effet direct sur l'export des ARNm (Figure 5B).

Finalement, en collaboration avec le laboratoire du Dre Oeffinger, nous avons voulu à identifier le rôle de la protéine Yhr127p dans l'export des ARNm et dans leurs métabolismes généraux. Cette protéine de 27kDa se trouve dans le noyau et une étude a montré qu'elle s'associe aux pores nucléaires<sup>29</sup>. Yhr127p a un domaine de liaison à l'ARN (RBD) et Oeffinger et al ont montré suite à des expériences d'immunoprécipitation (pull-out), que cette protéine se trouve attachée à l'ARNm depuis sa naissance, jusqu'à son arrivée au pore nucléaire<sup>163</sup>. Elle ne voyage pas avec l'ARNm jusqu'au cytoplasme. Curieusement, cette protéine ressemble à Yra1p.

## 1.22 Pourquoi *S. cerevisiae* comme organisme modèle?

L'histoire de la biologie est marquée par des découvertes majeures faites par des personnes assez chanceuses pour choisir un organisme convenant parfaitement au type de recherche envisagé. Mendel a choisi le Pois, d'autres ont choisit la drosophile ou les bactéries. Mais dans notre cas, nous avons choisi la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Au milieu des années 1930, elle a été introduite comme un organisme qui convient à la recherche scientifique par H. Roman. *S. cerevisiae*, comparée à d'autres organismes eucaryotes, a plusieurs avantages. En plus d'être unicellulaire, elle est un eucaryote simple. On peut la faire pousser dans des milieux bien défini, ce qui donne aux chercheurs le plein contrôle sur les paramètres environnementaux. Son cycle de vie peut alterner entre une phase diploïde ou une phase haploïde. Les cellules haploïdes ont un des deux types sexuels; type alpha ( $\alpha$ ) ou type a et l'accouplement entre les 2 types donnent des cellules diploïdes.

Donc nous avons trouvé que la levure était un système idéal pour étudier l'export des ARNm, car plusieurs chercheurs qui ont étudiés le processus d'export des ARNm et qui voulaient déterminer les protéines et nucléoporines impliquées dans ce processus, ont utilisés la levure comme modèle<sup>128,129,133,148,164,165</sup>. De plus, la levure est un eucaryote très simple et sert de modèle pour les autres eucaryotes, comme l'humain. De nombreux gènes chez la levure sont exprimés à un niveau très faible<sup>166</sup>. Par conséquent, une quantification de l'expression de l'ARNm peut être effectuée. La petite taille d'une cellule de levure est également avantageuse dans ce cas, permettant l'analyse des niveaux d'expression dans de nombreuses cellules individuelles en même temps<sup>166</sup>. Alors les études d'expression et de localisation peuvent donc être effectuées avec une précision inégalée. Aussi, les levures ont

des noyaux relativement petits, donc cela réduit le volume dans lequel les ARNm peuvent diffuser et alors, nous pouvons presque voir tout le noyau ce qui les rend idéales pour les études utilisant le microscope.

### **1.23 Qu'elle est l'approche expérimentale utilisée pour atteindre notre objectif?**

Choisir les bonnes techniques pour étudier le processus d'export des ARNm et répondre à nos questions de façon précise et directe était cruciale. La majorité des techniques utilisées précédemment pour étudier le processus d'export des ARNm vers le cytoplasme, comme les interactions protéine-protéine, immunoprécipitation de protéine, la technique double hybride et l'immuno-buvardage ne permettent pas de visualiser en temps réel les molécules d'ARNm et leurs mouvements/trajectoires dans la cellule. Également, ces techniques ont des limites car nous ne pouvons pas regarder des événements individuels et nous devons isoler beaucoup de matériels (comme beaucoup d'ARN dans le cas du buvardage de type Northern) provenant de beaucoup de cellules, ce qui cause la perte de la variabilité dans l'expression des gènes d'une cellule à une autre. Mais récemment, des techniques de molécules uniques (single molecule techniques) ont fait leurs apparitions, ce qui a aidé énormément la communauté scientifique à comprendre plus en détails les mécanismes du fonctionnement de la cellule parce que les chercheurs peuvent regarder le comportement, la dynamique et les interactions de leurs molécules en question avec une extrême précision et très bonne résolutions.

## 1.24 Hybridation in situ en fluorescence

Conséquemment, pour pouvoir répondre à nos questions, localiser et suivre nos ARNm, nous avons choisis d'utiliser deux techniques qui requièrent l'utilisation d'un microscope: l'hybridation in situ en fluorescence qui permet de détecter les ARN individuels (smFISH)<sup>167</sup> et le marquage des ARNm avec la GFP en utilisant le système PP7 et d'autres systèmes similaires<sup>168</sup> (Figure 6). Le smFISH est une technique qui permet de détecter des ARN uniques (single mRNAs) dans des cellules fixées, en utilisant un ensemble de sondes d'ADN marquées avec des fluorophores organiques (comme cy3, cy5, etc) qui vont s'hybrider à une séquence spécifique sur l'ARN étudié (Figure 6A).

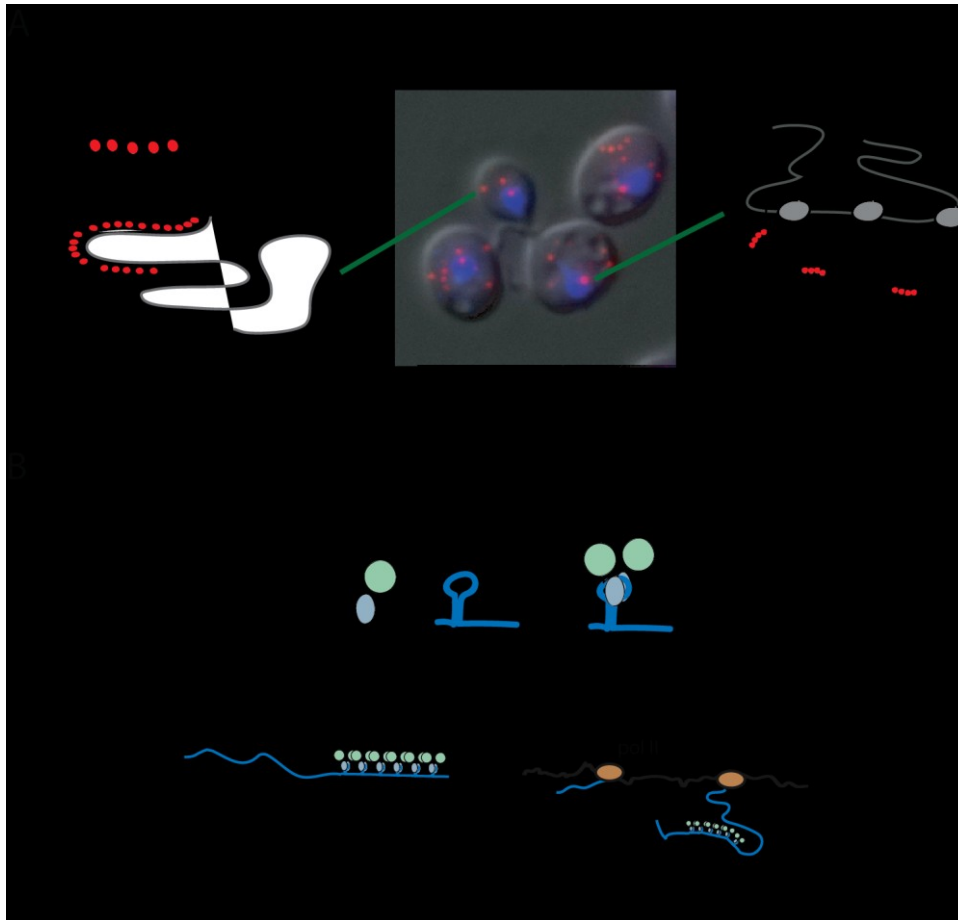
Un avantage de cette technique est que l'ARN étudié ne requiert pas de modifications génétiques. De plus, on peut observer l'expression de plusieurs gènes en même temps car il est possible d'utiliser différents ensemble de sondes marquées avec différents fluorophores. Cette technique permet d'acquérir des données quantitatives sur l'expression des gènes parce qu'on peut étudier et analyser l'expression des gènes dans plusieurs cellules à un moment précis. Contrairement aux autres techniques où il faut collecter plusieurs cellules pour détecter les ARN (comme le buvardage de type Northern), cette technique permet de détecter la variabilité de l'expression des gènes d'une cellule à une autre.

## 1.25 Le système PP7

D'un autre côté, le système PP7 permet de détecter des ARN uniques (single mRNAs) dans des cellules vivantes et en temps réel en marquant l'ARNm en question avec des protéines fluorescentes<sup>169,170</sup> (Figure 6B). Avec l'aide d'une protéine de bactériophage

appelée PP7, fusionnée à une protéine fluorescente (comme la GFP), nous pouvons visualiser des ARN<sup>170</sup>. Cependant, il faut manipuler génétiquement le gène/ARNm étudié en ajoutant des tiges-boucles en 5' ou 3' de l'ARNm. Les protéines PP7 fusionnées à une protéine fluorescente ont une très grande affinité pour ces boucles (chaque tige-boucle peut lier 2 protéines PP7-GFP), ce qui permet aux ARNm de devenir fluorescent.

Un avantage de cette technique comparé au smFISH est que l'on peut suivre en temps réel les ARNm, étudier leurs comportements, leurs dynamiques. Comme le smFISH, nous pouvons détecter des ARNm dans le noyau et le cytoplasme de la cellule. Toutefois, il est difficile d'étudier l'expression du gène en question avec le système PP7 car on visualise seulement quelque cellule à un moment précis. Le marquage des ARN avec le système PP7 ressemble énormément au marquage des ARN avec le système MS2, mais avec quelques différences. Premièrement, la séquence des tiges-boucles est différente, de même que la séquence qui se lie deux tiges-boucles (linker). Également, la protéine provenant d'un bactériophage (PP7 dans le cas du système PP7 et MS2 dans le cas du système MS2) qui permet son attachement aux tiges-boucles est différente.



**Figure 6. Détecter des ARN dans une seule cellule.** (A) La technique single molecule fluorescence in situ hybridation (smFISH) permet de détecter des ARN uniques (single RNAs) dans des cellules fixées en utilisant plusieurs sondes d'ADN marquées avec des fluorophores organiques qui s'hybrident à des séquences spécifiques sur l'ARNm étudié. Cette technique permet de détecter des ARNm uniques (single mRNAs) comme dans le cytoplasme, mais aussi des sites de transcription dans le noyau. (B) Détecter des ARNm uniques (single mRNAs) dans des cellules vivantes et en temps réel, en marquant l'ARNm étudié avec tiges-boucles. En se basant sur une interaction entre ces tiges-boucles et une protéine de phages (PP7) lié à un GFP, les ARNm deviennent fluorescent. Cette technique permet également de détecter les sites de transcription dans le noyau.

## 1.26 Comment suivre et déterminer la trajectoire des ARNm?

Finalement, pour analyser le comportement des ARNm, nous les avons suivis à l'aide d'un « sub-diffraction particle tracking software » qui utilise un « 2D Gaussian Fit ». Cet algorithme permet de détecter et localiser les ARNm en se basant sur leurs radius et intensité. Cet algorithme localise précisément le centre de chaque ARNm et créer une voie (track) pour chaque ARNm (Voir sections résultats pour plus de détails).

En utilisant les techniques mentionnées ci-haut, nous avons été capables de visualiser des ARNm uniques. Nous avons trouvé que les ARNm glissent sur l'enveloppe nucléaire, une fois à la périphérie du noyau. De plus, nous avons choisi de nommer ce phénomène, le « scanning ». Également, nous avons trouvé que le « scanning » requiert la présence de la partie C-terminale de Mlp1p. Finalement, nous avons découvert que Yhr127p joue un rôle durant la transcription.



## **Elucidating the role of the nuclear basket in export process**

Saroufim, M-A, Zenklusen, D

Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

MAS created all yeast strains included in this thesis, performed experiments and data analysis,  
and discussed data with DZ

Submission is planned for early 2015

## Chapitre II: Introduction in English

The export of mRNAs from the nucleus to the cytoplasm is one of the many fundamental steps of the gene expression pathway and is essential for mRNAs to reach the sites of translation (Figure 1). Nuclear export occurs through the nuclear pore complex (NPC) (Figure 2), a large macromolecular complex embedded in the nuclear membrane. On the nuclear side of the NPC, eight protein filaments, mainly composed of Mlp1p and Mlp2p, protrude from the central scaffold into the nucleoplasm and converge in a distal ring to form the nuclear basket<sup>101,104,110,128</sup> (Figure 4). The nuclear basket is therefore the first structure mRNPs encounter when reaching the nuclear periphery. Furthermore, the nuclear basket functions as both gatekeeper and physical barrier, and is the site where mRNA quality control steps occur<sup>114,122</sup>. These steps involve structural rearrangements of mRNPs, induced by the local modification of RNA binding proteins, and their release from the mRNA before export.

mRNA export is not an isolated process but is directly connected to different cellular processes, in particular transcription. For an RNA to be exported to the cytoplasm, it has to be folded, processed and finally assembled into an export-competent mRNP (Figure 3). In addition, all these events happen co-transcriptionally. For example, the THO (formed of Hpr1p, Mft1p, Tho2p and Thp2p) and TREX (formed of THO, Tex1p, Sub2p and Yra1p) complexes are recruited to the elongating RNA polymerase II, via interactions with the C-terminal domain (CTD) of the large subunit of RNA polymerase II. These complexes, in turn, recruit export factors to the nascent mRNA, making it competent for export<sup>71,78,118,171</sup>. Finally, a surveillance mechanism ensures that only mature mRNAs are released from the transcription site into the nucleoplasm<sup>171</sup>.

Studying the dynamics and kinetics of mRNA export was difficult in the past, in part because most of the traditional techniques used were not able to visualize mRNA export in real time (for example: protein-protein interactions, two hybrid experiments, western blots). Lately, advances in single molecule microscopy approaches made it possible to detect and localize single mRNAs in fixed and living cells; providing a direct readout to study mRNA export<sup>167-170</sup>. To study mRNA export we therefore applied such tools, in particular single molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH) and the tagging of single mRNAs with fluorescent proteins using a variant of the MS2 system (Figure 6). We investigated how mRNAs behave in the nucleoplasm after being released from the transcription site (Figure 5A) and determined the role of the nuclear basket and a number of RNA export factors in the export process.

Furthermore, we tested a hypothesis issued by Blobel in 1985<sup>158</sup> in which he speculated that genes physically interacting and transcribed at an NPC would be exported from this exact same NPC. To better understand the behavior of mRNAs in the nucleus in a quantitative manner and to investigate the role of the basket in the export process, we used a sub-diffraction particle tracking software that enabled us to precisely localize and track single mRNAs in the nucleus and to calculate different parameters in relation to the mRNA's movement. Lastly, we examined the role of YHR127p, a nuclear protein, shown to interact with mRNAs from transcription until they reach the NPC in mRNA biogenesis<sup>163</sup>.

Using the techniques mentioned above, we showed that single mRNAs scan the nuclear envelope (NE) when reaching the nuclear periphery and this occurs in an C-terminal

Mlp1p-dependent fashion. Other endogenous mRNAs, notably, *MDN1* and *CLB2*, also showed scanning behaviour.

Interestingly, we found that 24PP7-*GLT1* mRNAs are released into the nucleoplasm after induction of transcription of the 24PP7-*GLT1* gene under control of the *GALI* promoter, even if the transcription site is located at the nuclear periphery. However, the endogenous *GALI* mRNA might be directly exported.

Finally, we found that Yhr127p plays a role during transcription and deleting it does not cause any nuclear accumulation of polyA RNAs.

## Chapitre III: Materials and methods

**Strains, media and culture conditions:** Yeast strains used are listed in Supplementary Table 1. Yeast strains were grown on YPD plates at 25°C or 30°C, depending on the strain background. Liquid cultures were inoculated with cells either from plates or directly from the -80°C stock and grown at 25°C or 30°C overnight and always analyzed under exponential growth conditions ( $OD_{600} < 0.8$ ) in YPD or synthetic minimal medium (SD). Yeast media were prepared according to « Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition ».

**Strain construction:** GAL1p-24xPP7-*GLT1* strains (see Supplementary Table 1) were constructed by inserting 24PP7 repeats into the 5'UTR of the *GLT1* gene (haploid BY4742) and exchanging the *GLT1* promoter to the *GALI* promoter by homologous recombination using a plasmid (pDZ305) cut with PacI and NotI to create a fragment that contains a HIS selectable marker, the *GALI* promoter followed by 24PP7 repeats. Nup188p-dTomato tagging was achieved by inserting the dTomato sequence to the C-terminus of *Nup188* coding sequence by homologous recombination using a PCR fragment amplified with Taq polymerase from pDZ264 and using primers 1062-1063 (see Supplementary Table 2 for information on the sequence of the primers). Diploids were made by mating the tagged BY4742 with a haploid BY4741. *GALI*-12xPP7 and 12xPP7-*GALI* strains were constructed by inserting 12PP7 repeats into the 3'UTR and 5'UTR of *GALI* respectively by homologous recombination using a PCR fragment amplified from pDZ617 using primers 1360-1361 (for 3'tagging) and 1362-1363 (for 5' tagging). GAL1 3'UTR and 5'UTR were reconstituted by removing the *ADHI* terminator and the G418 marker located after the 12xPP7 repeats using

GAL induced CRE recombinase (pDZ296). Nup188p-dTomato tagging was done as mentioned before. Diploids were obtained by mating the tagged BY4741 with a haploid BY4742. *CLB2*-12xPP7 and *MDN1*-12xPP7 strains were constructed by inserting 12PP7 repeats into the 3'UTR of *CLB2* and *MDN1* respectively by homologous recombination using a PCR product amplified from pDZ617 and primers 1274-1275 (for *CLB2* tagging) and 1248-1249 (for *MDN1* tagging). *CLB2* and *MDN1* 3'UTRs were reconstituted by removing the *ADHI* terminator located after the 12xPP7 repeats using CRE recombinase (pDZ296). Nup188p-2xmCherry tagging was done by inserting the 2xmCherry sequence to the C-terminus of *Nup188* coding sequence by homologous recombination using a PCR fragment amplified with Taq polymerase from pDZ585 and using primers 1062-1063. Strains containing NLS-2xmCherry were done by transforming the plasmid pDZ628. Knockout mutants were done by homologous recombination using a PCR fragment amplified with Taq or Q5 from plasmid pDZ498 using primers in supplementary Table 2 in both haploids type strains before mating. *nab2F73D* cells were constructed by transforming a PCR product amplified with Q5 from plasmid pDZ706 and using primers 1480-1481. PP7-PS-2xeGFP fusion was expressed from the *Met25* (pDZ514 or pDZ529) or *ADE3* (pDZ536) promoter. Yhr127p-GFP tagging was achieved by inserting the GFP sequence to the C-terminus of *YHR127* coding sequence by homologous recombination using a PCR fragment amplified with Taq polymerase from a plasmid containing a GFP + Kan marker and using primers given to us by the Oeffinger Lab. Diploids were made by mating the tagged BY4742 with a haploid BY4741. Tagging of Gar1p-2xmCherry and Spc42-2xmCherry was achieved by inserting the 2xmCherry sequence to the C-terminus of *GAR1* and *SPC42* coding sequence by homologous

recombination using a PCR fragment amplified with Taq polymerase from from pDZ583 and using primers 395-396 (for *GARI* tagging) and primers 320-321 (for *SPC42* tagging).

**Plasmid construction:** The *NAB2* F73D plasmid was obtained by amplifying part of the *NAB2* wild-type gene (+720 bp after ATG to +482 bp after the stop) and inserting the mutation using PCR primers (1466-1467 in Supplementary Table 2) and the Q5 polymerase. The PCR product is cloned as a BamHI and BglII fragment into pFa6-hphNT1 (pDZ498) to create pDZ706. The plasmid was verified by sequencing. The NLS-2xmCherry plasmid was obtained by cutting plasmid pDZ450 and pDZ545 with SacI and XbaI. The fragment from pDZ545 is cloned into pDZ450 to create pDZ629. The plasmid was verified by looking at fluorescence in transformed yeast cells.

**Yeast transformation:** Yeast were inoculated at very low OD<sub>600</sub> and grown in YPD overnight at 25°C or 30°C (depending on the strain) to a final OD<sub>600</sub> of 0.6. Cells were centrifuged at 4000 r.p.m. for 2 min and washed with 25mL of ddH<sub>2</sub>O then resuspended in 400μL. 50μL were taken out of the 400μL and cells were centrifuged and ddH<sub>2</sub>O was taken out. 240μL of 50% Polyethylene glycol (PEG), 36μL of 1M LiAC, 0.05μg of ssDNA, DNA for transformation (plasmid or linear double stranded DNA) and ddH<sub>2</sub>O were added to the pellet to reach 360μL. Cells were resuspended in this mix and vortexed for 1 min at full speed and heat shocked for 40min at 42°C. Cells were centrifuged at 13000 r.p.m. for 30sec and washed with 1mL ddH<sub>2</sub>O. Finally, cells were resuspended in 100μL ddH<sub>2</sub>O, plated on a selective plate and incubated at 25°C or 30°C (depending on the strain).

**Preparing poly-L-lysine coated coverslips for smFISH experiments:** 18mm round coverslips are put into 500mL 0.1N HCl and let boil for 10 min. Coverslips were rinsed

extensively with H<sub>2</sub>O and stored in 70% ethanol. 150µL of 0.01% poly-L-lysine (Sigma #P8920) are dropped on each coverslip and left for 10 min at room temperature. Poly-L-lysine is removed and the coverslip is left to air dry then washed twice with H<sub>2</sub>O and left to air dry.

**Single molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH):** Cells were grown in YPD (for PolyA FISH experiments) overnight at 30°C to mid-log phase (OD<sub>600</sub> between 0.4-0.8). Cells were fixed by adding paraformaldehyde (Electron Microscopy Science #15714) to a final concentration of 4% for 45 min at room temperature with shaking, then washed 3 times with 10 mL Buffer B (1.2M sorbitol, 100mM KHPO<sub>4</sub>, pH 7.5) and stored overnight at 4°C in 1mL Buffer B. Cell walls were digested by adding 500µL of a solution made of 5µL of lyticase (125 units) (Sigma #L2524, resuspended and dissolved in 1xPBS), 300µL of 2M sorbitol, 50µL of 1M KHPO<sub>4</sub> pH7.5, 50µL of 200mM ribonucleoside vanadyl complex (VRC) (heated for 5 min at 65°C before), 0.7µL of 14.3M β-mercaptoethanol and 94.3µL of ddH<sub>2</sub>O for 5 min at 30°C. Cells were centrifuged at 3500 r.p.m using a cooled centrifuge for 3 min and washed 2 times with 1mL chilled Buffer B. Digested cells were deposited on poly-L-lysine coverslips and kept at 4°C for 30 min, then stored in chilled 70% ethanol at -20°C overnight in a 12 well cell culture plates overnight. Before hybridization, coverslips with cells on them were removed from 70% ethanol, washed 5 min twice with saline sodium citrate (2xSSC) and hydrated in 10% formamide/2xSSC for 10 min. 0.5ng of labeled probes are dried then resuspended in 10% (v/v) formamide, 2xSSC, 1mg/ml BSA, 10mM VRC (NEB #S1402S), 5mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 0.5mg/ml *Escherichia coli* tRNA and 0.5 mg/ml ssDNA and hybridization is done overnight at 37°C in the dark. Coverslips were then washed twice for 15 min in 10% formamide/2xSSC heated at 37°C, 0.1% Triton X-100/2xSSC for 15 min at room temperature, 1xSSC for 15 min at room temperature and 1xPBS for 5 min at room



temperature. Coverslips were dried in 100% ethanol and mounted on glass slides using ProLong® Gold with DAPI mounting medium (Invitrogen #P36934) and kept at 4°C overnight before imaging.

**Liquid smFISH:** Cells were grown in YPD (for PolyA FISH experiments) or in SD complete in 3% raffinose (to test if the reporter functions correctly) overnight at 30°C to mid-log phase (OD<sub>600</sub> between 0.4-0.8). The transcription of the *GLT1* gene under the *GALI* promoter is done by inducing the cells grown in raffinose by adding 3% galactose. Cells were fixed by adding paraformaldehyde (Electron Microscopy Science #15714) to a final concentration of 4% for 45 min at room temperature with shaking, then washed 3 times with 10 mL Buffer B (1.2M sorbitol, 100mM KHPO<sub>4</sub>, pH 7.5) and stored overnight at 4°C in 1mL Buffer B. Cell walls were digested by adding 500µL of a solution made of 5µL of lyticase (250 units) (Sigma #L2524, resuspended and dissolved in 1xPBS), 300µL of 2M sorbitol, 50µL of 1M KHPO<sub>4</sub> pH7.5, 50µL of 200mM ribonucleoside vanadyl complex (VRC) (heated for 5 min at 65°C before), 0.7µL of 14.3M β-mercaptoethanol and ddH<sub>2</sub>O for 5 min at 30°C. Cells were centrifuged at 3500 r.p.m using a cooled centrifuge for 3 min and washed 3 times with 1mL chilled Buffer B then resuspended in 100µL of 10% formamide/2xSSC. 20-25ng of labeled probes are dried then resuspended in 10% (v/v) formamide, 2xSSC, 1mg/ml BSA, 10mM VRC (NEB #S1402S), 5mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 0.5mg/ml *Escherichia coli* tRNA and 0.5 mg/ml ssDNA. Hybridization is done by resuspending the cells with the labeled probes mix and kept at 37°C overnight in the dark. Cells were centrifuged for 3 min at 3500 r.p.m. and washed for 6 min with 100µL 10% formamide/2xSSC heated before at 37°C, 100µL 0.1% Triton X-100/2xSSC for 6 min and with 100µL of 1xPBS for 6 min and finally resuspended in 15µL of 1xPBS. 5µL out of the 15µL are dropped on poly-L-lysine coated coverslips until

they dry. 50 $\mu$ L of 100% ethanol is dropped on each coverslip then dipped in 70% ethanol, 2xSSC, 1xPBS and 100% ethanol. Coverslips are left to dry and then mounted on glass slides using ProLong® Gold with DAPI mounting medium (Invitrogen #P36934) and kept at 4°C overnight before imaging.

**Image acquisition and analysis for smFISH:** Cells were imaged using an upright epifluorescence microscope (Zeiss Z2) using a 100x/1.4 NA Zeiss objective. Illumination was achieved using X-Cite light source and specific filter cubes (Chroma Filters 31000 (DAPI), 41001 (fluorescein isothiocyanate (FITC)), SP-102v1 (Cy3/DyLight550), SP-103v1 (Cy3.5/DyLight594) corresponding to excitation and emission spectra of the smFISH labelled probes used. Images were acquired using Zen 2012 software and a Zeiss AxioCam MRm camera. Visualization of single molecules was achieved using 50ms exposure for DAPI, 600ms exposure for GFP, 1000ms for Cy3, 1500ms for Cy3.5. 3D image data sets were acquired with 0.2 $\mu$ m z stacks covering the entire depth of cells. The z stacks were projected into a 2D plane by applying a max projection using ImageJ.

**Well Coating for live cell imaging:** We coated wells of a 96 glass bottom MicroWell plate (MGB096-1-2-LG-L #0325289L2L) by adding 100 $\mu$ L of 1mg/mL Concanavalin A (Con A) (Sigma #SLBH3233V) in each well for 10 min. After taking out the Con A, 100 $\mu$ L of a solution made of 50mM CaCl<sub>2</sub> + 50mM MnSO<sub>4</sub> was added to each well for 10 min. Finally, this solution is taken out from each well and 100 $\mu$ L of ddH<sub>2</sub>O is added to them.

**Live-Cell Imaging:** Yeast were inoculated and grown in synthetic minimal medium (SD) with 3% raffinose (when imaging strains were the *GLT1* gene is under the *GALI* promoter or when imaging strains were the *GALI* mRNA is tagged) or SD with 2% glucose (for cells were

*MDN1* and *CLB2* are tagged with12xPP7) overnight at 25°C or 30°C (depending on the strain) to an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.6. Cells grown in SD with raffinose were induced by adding 3% of galactose. 100 μL cell suspension were put in a pre-coated well and the plate is centrifuged for 10 seconds at 2000 r.p.m.

**Movie acquisition and analysis:** Plates were taken to the microscope and placed on a stage at room temperature. Cells were imaged on an spinning disk confocal microscope (Zeiss) using a 100x/1.4 NA Zeiss objective. For fluorescence excitation sources we used 488nm and 561nm lasers lines to image GFP, dtomato (and mCherry) respectively. Fluorescence was filtered using BP 525nm/50nm (for imaging GFP) and FF02 617nm/73nm (for imaging dtomato and mCherry) Semrock emission filters. Cells were imaged using an EMCCD camera (Evolve photometrics). Images and movies were acquired using Zen 2012 software. Visualization of single molecules and acquiring movies was achieved using 18.5ms and 37ms exposure times for single mRNAs and pores, and 33ms exposure time for Yhr127p protein, and between 100ms and 150ms exposure times for Nup188-dtomato, Nup188-2xmCherry and NLS-2xmCherry. RNA signals were detected and tracked using a spot-detection algorithm fitting a 2D Gaussian mask created and written by Daniel R. Larson implemented with custom made software for the IDL platform (ITT Visual Information Solutions)<sup>172</sup>.

**Statistical analysis:** Statistical analysis was performed using Excel (Microsoft) and Prism (GraphPad). Distances travelled by an mRNA at the periphery were calculated using coordinates given by the spot-detection algorithm and by using the following formula:

$$D = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

were  $x_1$  and  $y_1$  are the coordinates of a specific mRNA at time 0ms and  $x_2$  and  $y_2$  are the coordinates of the same mRNA after 37ms (next frame).

## Chapitre IV : Results

### Section I: Studying mRNA export in yeast

As mentioned in the introduction, the cell has to translate the information stored in DNA into proteins using mRNA as an intermediate molecule. This latter has to be exported from the nucleus to the cytoplasm, where it will be translated into a protein. Export is connected to different upstream processes in the gene expression pathway, starting with transcription, when mRNA export factors (Yra1p, Mex67p, Nab2p and others) bind to the nascent mRNA and help maturing and prepare this latter to be exported to the cytoplasm.

The main focus of my Master thesis is to determine how mRNAs get exported and investigate the role of the nuclear periphery in this process. To achieve this, we use single molecule microscopy techniques (Fig.6) that allow us to detect single mRNAs and track their movements.

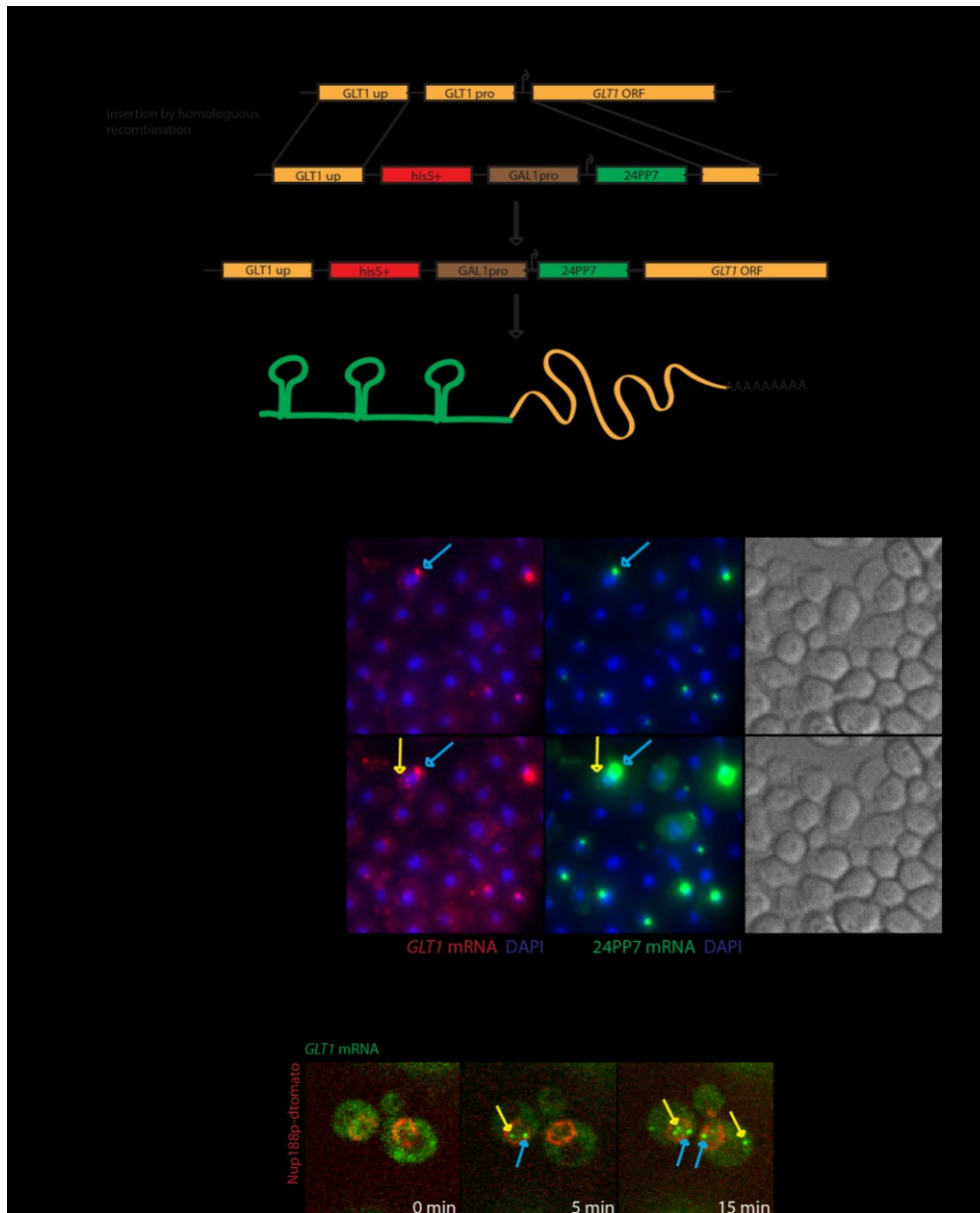
#### 4.1.1 Construction and characterization of the GAL1p-24PP7-GLT1 reporter

To be able to detect single mRNAs, follow them in real time and ultimately understand the rules that govern the behaviour of single mRNAs in living cells, we constructed a reporter gene by tagging the *GLT1* locus with 24 PP7 repeats in the 5' untranslated region (5'UTR) (Fig.7A). The *GLT1* gene is a nonessential gene that encodes a protein called glutamate synthase, and can therefore be repressed without causing any growth defects<sup>173</sup> As described

in the introduction, each PP7 repeat binds two copies of the PP7 bacteriophage coat proteins (PP7-GFP, see Fig.6B).

To express the PP7-GFP protein, we generated a transient expression vector, in which the PP7 protein was fused to two eGFP proteins under control of either the *MET25* promoter or the *ADE3* promoter. Therefore, in the case where all PP7 binding sites were folded correctly and were bound to two PP7 coat proteins, each mRNA was labeled with 98 GFP proteins, creating sufficient signal to noise, and thereby allowing detection of single *GLT1* mRNAs. Furthermore, as mentioned above, the *GLT1* gene was placed under control of the inducible *GALI* promoter, which is repressed in the presence of glucose and induced when the sugar source is changed to galactose. Therefore, the expression of the reporter gene can be controlled by switching the sugar source from glucose to galactose.

Integration of the 24PP7 repeats and the *GALI* promoter into the *GLT1* gene was achieved by the transformation and homologous recombination of a cloned linear DNA fragment containing a *HIS* selectable marker and the *GALI* promoter followed by 24PP7 repeats in wild-type (WT) yeast cells (Fig.7A). Specifically, this linear DNA was flanked at the 5' end by the *GLT1* upstream sequence (sequence upstream of the *GLT1* promoter) and at the 3' end by a sequence identical to the beginning of the *GLT1* ORF, allowing the reporter construct to be inserted in the correct genomic location. Consequently, the insertion replaced the *GLT1* promoter with the *GALI* promoter and 24PP7 repeats in the 5' UTR of the *GLT1* gene. Genomic DNA from colonies grown on selective media was extracted and tested by PCR (See Supplementary Table 2 for primers sequence).



**Figure 7: The *GLT1* reporter construct.** (A) To create an inducible fluorescent RNA, 24PP7 repeats were inserted in the 5' of the *GLT1* gene and the *GLT1* promoter is exchanged to the *GAL1* promoter by homologous recombination. After induction of transcription by galactose, the 24PP7 sequence will generate 24 PP7 loops which are then bound to PP7 coat protein GFP fusion proteins. (B) Characterizing the GAL1p-24PP7-*GLT1* reporter using smFISH. smFISH detecting *GLT1* mRNA (red) and 24PP7 repeats (green) of the GAL1p-24PP7-*GLT1* reporter in wild-type cells. Cells were grown at 30°C in SD + 3% raffinose then the transcription of the GAL1p-24PP7-*GLT1* was induced by adding galactose before fixation. Nuclear DNA was stained using DAPI (blue). (C) Characterizing of the GAL-24PP7-*GLT1* reporter using live cell fluorescent imaging at different time points after inducing cells with galactose. The nuclear envelope is labeled after tagging the nuclear pore protein, (Nup188p), with a red fluorescent protein (dtomato) and the mRNA is labeled in green using PP7-GFP. Transcription sites are marked by the blue arrow while single 24PP7-*GLT1* mRNAs are marked by a yellow arrow. Cells were grown at 30°C in 3% raffinose before induction with galactose.

In positively transformed clones, transcription of the *GLT1* gene was induced by the addition of galactose. The 24 loops in 5' end of the nascent *GLT1* mRNA will be bound by PP7-GFP, creating a fluorescent RNA.

In most of the experiments described below, we studied the behavior of mRNAs in diploid cells, mainly because they have a larger nucleus than haploid cells. This facilitated the tracking and precise determination of the position of single *GLT1* mRNAs in the nuclei of diploid yeast. Notably, the diploid cells carried one 24PP7-*GLT1* allele under the control of the *GALI* promoter and one wild type *GLT1* allele. Induction of 24PP7-*GLT1* transcription with galactose led to the release of many transcripts in a short period of time.

To test whether the reporter allowed us to follow transcription and mRNA export, we first used smFISH to look at the expression of the PP7-*GLT1* mRNA upon galactose induction (Fig.7B). To detect the RNA, we used two sets of probes; one that hybridized to the PP7 part of the mRNA (green) and a second that hybridized to the *GLT1* part of the mRNA (red). As shown in Fig.7B, we observed spots with different intensities. The brighter spots in the nucleus represent the sites of transcription, where multiple nascent mRNAs are still associated with the *GLT1* gene (blue arrow). The additive signal of each single nascent mRNA gives this brighter signal. The less intense spots represent single mRNAs (yellow arrow). Importantly, every PP7 signal colocalized with a *GLT1* signal both in the nucleus and in the cytoplasm of the cells (yellow arrow), indicating that all the PP7 signals were associated with a *GLT1* mRNA signal.

Next, we tested our system in living cells at different time points after the addition of galactose to the media. Figure 7C shows that at time zero, no signal was detected as the cells



do not express 24PP7-*GLT1* mRNAs in the absence of galactose. The diffuse green signal originates from free PP7-GFP molecules that are not bound to any RNA and therefore represents the background fluorescence. After 5 minutes of galactose induction, two nuclear signals appeared. One originating from nascent RNAs bound to PP7-GFP, which marks the site of transcription (blue arrow) and one originating from a single mRNA bound to PP7-GFP in the nucleoplasm (yellow arrow). After 15 minutes, we continued to observe bright transcription sites indicating ongoing 24PP7-*GLT1* transcription as well as single RNAs (yellow arrow) in the cytoplasm, demonstrating that mRNAs are exported to the cytoplasm. These results show that our system behaves as predicted and that our reporter is suitable to study how mRNAs behave in the nucleus before they are exported to the cytoplasm.

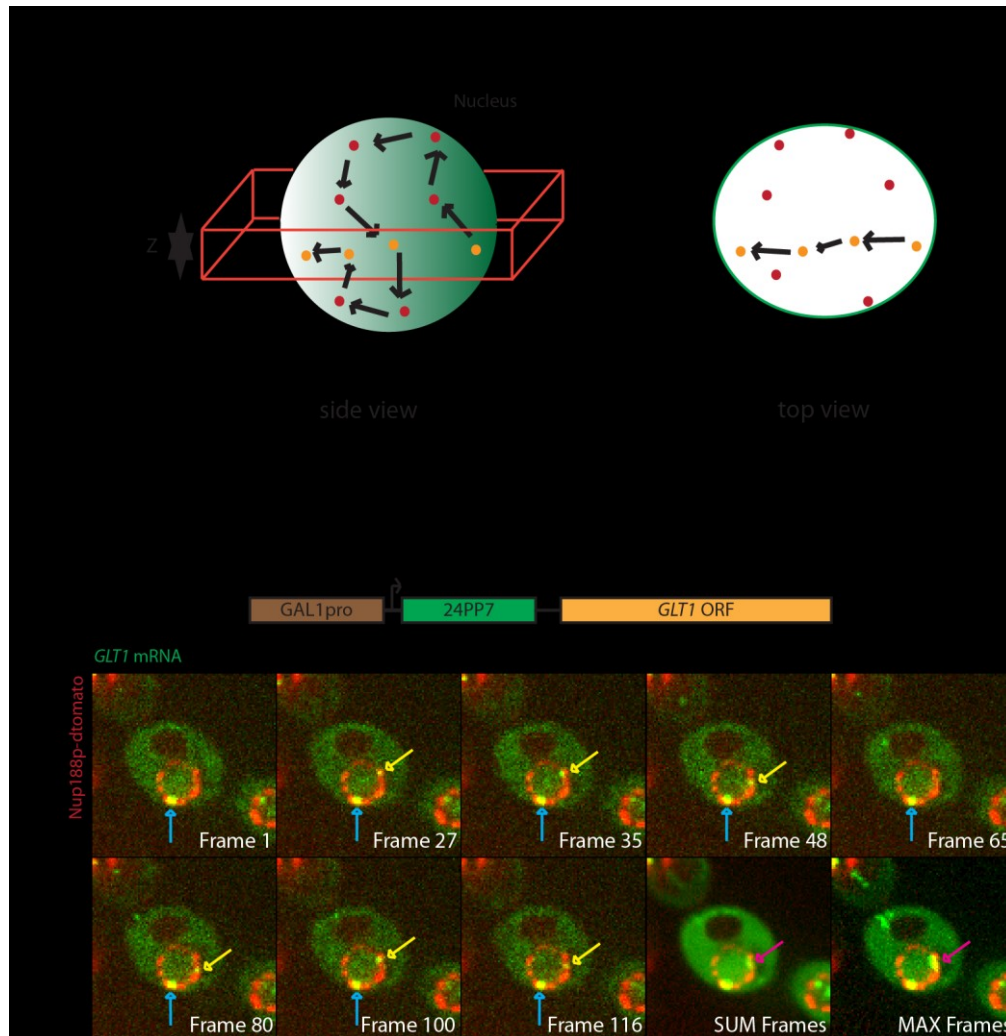
#### **4.1.2 Imaging RNAs in real time**

Next, we initiated a study of the behavior of nuclear 24PP7-*GLT1* mRNAs by following them in living cells. Imaging of single RNAs is challenging for several reasons: 1) single mRNAs are not very bright and 2) they move rapidly in three-dimensions (3 D). Therefore, we needed a very sensitive imaging equipment that allows image acquisition at fast frame rates. Towards this end, we used a spinning disk confocal microscope, equipped with a sensitive EMCCD camera, which facilitated mRNA detection in living cells. An EMCCD is an image sensor that is capable of detecting single photon events without an image intensifier and is extremely sensitive because it has a very high quantum efficiency. Quantum efficiency is the ability of a camera to convert photons to electrons. Furthermore, the Photometrics Evolve camera used enabled us to image streaming rates at a speed of 29.6ms per frame using

the full 512x512 imaging array, and at even faster frame rates when using only half the chip/array (256 x 256: 15.25ms per frame) or a quarter (128 x 128:8.06ms per frame).

However, sensitivity is only one of the challenges encountered when imaging fast diffusing molecules in a living system. In order to image fast, we had to acquire images in 2 dimensions (2D). Since, the yeast nucleus has a spherical form, we could only image part of the yeast nuclear volume at any given time (Figure 8A). A single optical section of our confocal imaging system detects approximately 800nm using a 100x objective. In other words, when imaging the yeast nucleus in a single z plane, we could see, depending on the signal intensity, a section of approximately 800nm in thickness of the yeast nucleus. Given that the diameter of the yeast nucleus in a diploid cell is approximately 1.6 $\mu$ m and that mRNAs move fast in all three dimensions (in 3 D), we were, therefore, not able to follow their full path throughout the entire nucleus, because we frequently lost the mRNAs from the focal plane.

This is illustrated in Figure 8A; when an mRNA moves freely in the nucleus imaged in 2 D, we only saw the mRNA in some of the frames (the mRNA is depicted in yellow). Therefore, when analyzing the behaviour of nuclear mRNAs, we were limited to follow RNAs in an 800nm section of the nucleus. Nevertheless, we used the frequency of losing mRNAs from the imaging plane as a measure of their behaviour, as mRNAs bound to a structure or those moving within a restricted space would have a different diffusive behaviour, and this, in turn, would influence the length of time an mRNA would spend in the observation plane. We used this information to study mRNA behaviour in the wild type and in different mutant strains (see below).



**Figure 8: Imaging of nuclear 24PP7-*GLT1* mRNAs.** (A) Figure showing how we image and look for single mRNAs. We image in 2D to look at mRNAs in the nucleus, but because the nucleus is a sphere and the mRNA can move in 3D, we might have an mRNA in the imaging plane (spot in yellow) and then lose it (spots in red) because they can go out of focus. (B) Series of images showing single 24PP7-*GLT1* mRNAs (yellow arrow) and a GAL1p-24PP7-*GLT1* site of transcription (blue arrow). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope is shown in red after tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 116 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 116 frames (see text).

### 4.1.3 Examining behaviour of the 24PP7-*GLT1* mRNA in the yeast nucleus

First, to be able to distinguish nuclear and cytoplasmic RNAs, we labeled the nuclear periphery by tagging a nuclear pore protein (Nup188p), with a red fluorescent protein. While the label does not allow us to distinguish the position of individual nuclear pore proteins, it does outline the nuclear envelope. We then induced transcription of the 24PP7-*GLT1* gene by adding galactose and after approximately 5min, we searched the field of observation for cells with strong transcription sites. Because we needed a high signal to noise ratio to, first, detect the single mRNAs and, second, to accurately detect their location, we used a high laser power setting during acquisition and could only image the cells for a limited amount of time before the GFP signal was bleached.

Using these imaging settings, we acquired approximately 500 frames at 37ms intervals, for a total imaging time of 10 seconds. Static frames from a typical movie are shown in Figure 8B, taken from supplemental movie 1. The bright signal shown in frame 1 colocalizing with the nuclear periphery was the site of 24PP7-*GLT1* transcription (blue arrow), and no other nuclear mRNA was observed. By frame 27 (~500ms), we saw a single mRNA appearing at the nuclear periphery (yellow arrow). This mRNA was either released from the site of transcription before the movie was started and was diffusing in the nuclear volume outside of our imaging plane or was released from the transcription site during imaging in a direction that led to the mRNA diffusing outside of the imaging plane.

In either of these cases, when reaching the nuclear periphery, the mRNA was neither immediately exported nor was it released back into the nucleoplasm; instead the mRNA

remained associated with the nuclear periphery, sliding along the nuclear envelope (frame 35 and 48). This association was not static, as the mRNA was lost from the imaging plane at a later point (frame 65). Another mRNA reappeared and did slide along nuclear envelope (frame 80, 100 and 116). However, there is a high possibility that the mRNA seen in frame 35 and 48, and the one seen in frame 80,100 and 116, might be the same one, because the nucleus does not contain high numbers of 24PP7-GLT1 mRNAs. Importantly, during this entire time of the movie, the transcription site did not significantly move; it remained attached to the periphery as previously described for *GAL* regulated genes<sup>19,150</sup>.

To characterize the behavior of these mRNAs, we used several image analysis tools. First, we determined the location where 24PP7-*GLT1* mRNAs spent the most time during the course of imaging. We performed a SUM projection, a function that sums up the signal intensity of each x and y position of every image in the 500 frames of the movie. A brighter signal in the SUM projection image therefore means that the mRNA remained in a particular place for a prolonged period of time. In addition, we analyzed the maximum intensity (MAX) projections of the movies, in which for any given pixel in an image, only the brightest signal of each frame was plotted. The MAX projection simply shows all the positions where mRNAs have spent time during the course of the movie. Therefore, they show the whole path of the mRNA. The SUM projection shows that when mRNAs are at the nuclear periphery, they spend most of the time in a small space on the NE, where the mRNAs slides for long periods of time (magenta arrow). Interestingly, this region shows a more intense Nup188p-dtomato signal (red), suggesting a higher local concentration of pores in this area of the nuclear envelope (NE). The MAX projection image shows the whole path of the mRNA. In particular, the MAX projection image shows that the mRNA slides on a small part of the NE (magenta

arrow). Based on these observations, we defined the process of mRNA sliding along the NE as « scanning ».

#### 4.1.4 Scanning is a general behaviour of nuclear mRNAs

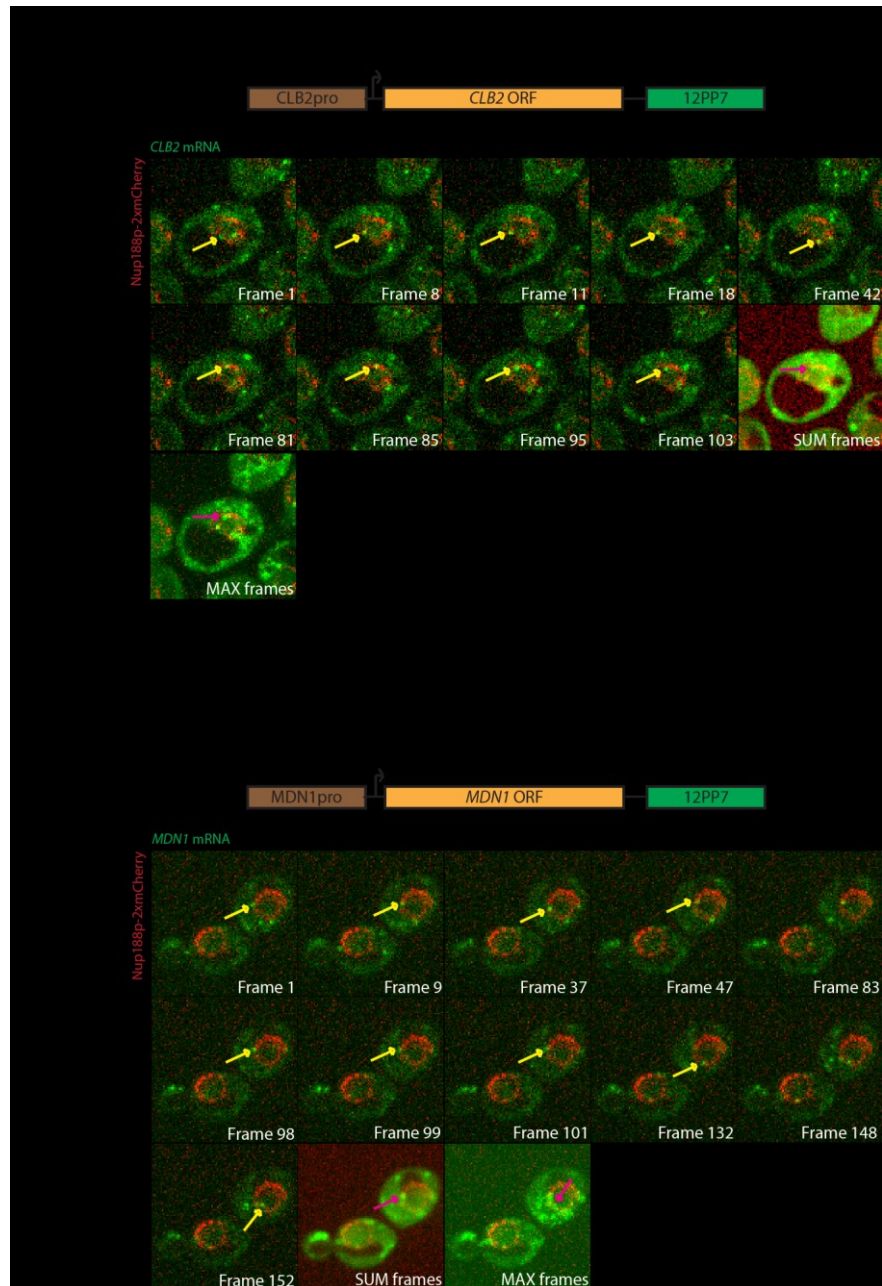
We next asked whether scanning is a general feature of mRNAs when they reach the nuclear periphery. To address this, we analyzed the behaviour of mRNAs expressed from the endogenous *CLB2* and *MDN1* genes. In contrast to the *GLT1* reporter, the *CLB2* and *MDN1* mRNAs are expressed from their endogenous promoters and tagged at the 3' end with 12 PP7 repeats, while maintaining their 3' untranslated regions (3'UTRs) unchanged. The *CLB2* gene is cell cycle regulated and is transcriptionally active during S phase<sup>174</sup>. Furthermore, the Clb2p protein has been implicated in promoting the transition from the G2 phase to the M phase of the cell cycle<sup>174</sup>. The *MDN1* gene is an essential gene, which has a role in ribosome biogenesis<sup>175</sup>. Tagging of *MDN1* with 24 PP7 repeats in the 3'UTR has previously been shown to not affect the regulation of expression of this gene<sup>170</sup>.

The major difference between imaging 3' tagged RNAs compared to 5' tagged RNAs is that, in the former case, transcription sites are rarely observed. This is because RNA polymerase II (RNA polII) first transcribes the Open Reading Frame (ORF) of the gene and then 12xPP7 tag. By the time the PP7 loops of the tag fold and become bound by the PP7-GFP proteins, thereby allowing detection of the mRNA, the mRNA is almost ready to be released in the nucleoplasm. In contrast, when the PP7 repeats are placed at the 5' of the gene, the RNA polII transcribes the repeats before the gene body, and the PP7-GFP proteins have sufficient time to bind to the loops during ongoing transcription elongation. Since more than one RNA polII complex simultaneously transcribes long genes, like *GLT1* and galactose

inducible genes, the transcription site signal gradually becomes brighter and transcription sites are more easily detected. As shown in Figures 9A and 9B, *CLB2* and *MDNI-12PP7* mRNAs were detected in the nucleus and in the cytoplasm, but no strong transcription sites were observed. Because these two genes are not strongly transcribed, it was challenging to find nuclear RNAs.

However, when nuclear mRNAs were detected, they showed a very similar behaviour to that observed for the 24PP7-*GLT1* mRNA described in the preceding sections. As shown for *CLB2* mRNA in Figure 9A, mRNAs scanned the NE (frame 11 and 15), were lost in the 3D nuclear volume for some time (frame 62) and reappeared within the same area of the NE, continuing to scan the periphery in a restricted volume (frame 108). When we summed all the frames of the movie, we noticed that *CLB2* mRNAs scan for longer periods of time in a specific place (magenta arrow).

We found a similar behaviour for *MDNI* mRNAs, which also scanned the nuclear periphery (Figure 9B). Once released from the transcription site into the nucleoplasm, all mRNAs examined so far, including the *GLT1* reporter and the endogenous *CLB2* and *MDNI* mRNAs, localized to the nuclear periphery and spent considerable time before being exported. However mRNAs tagged using this system get exported as we detect cytoplasmic mRNAs. Actual export events could be observed, albeit very rarely, and is not the focus of the present study (Supplementary movie 1 and figure S1).



**Figure 9: *CLB2*-12PP7 and *MDN1*-12PP7 mRNAs also scan the nuclear periphery.** Series of images showing single *CLB2*-12PP7 and *MDN1*-GLT1 mRNAs (yellow arrows). Movies were acquired at 37 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + glucose at 30°C. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with 2xmCherry, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 103 frames for movie in (A) and 152 frames for movie in (B) and MAX frames indicates maximum intensity projection of 103 frames for movie in (A) and 152 frames for movies in (B) (see text).

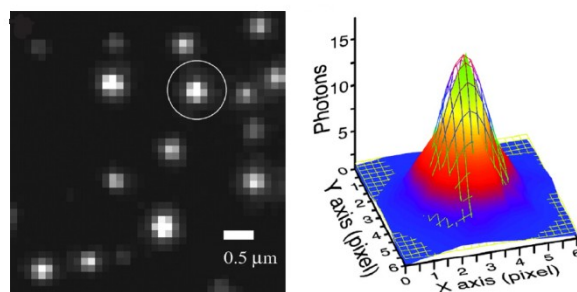


### **4.1.5 Quantitative analysis of mRNA scanning behaviour**

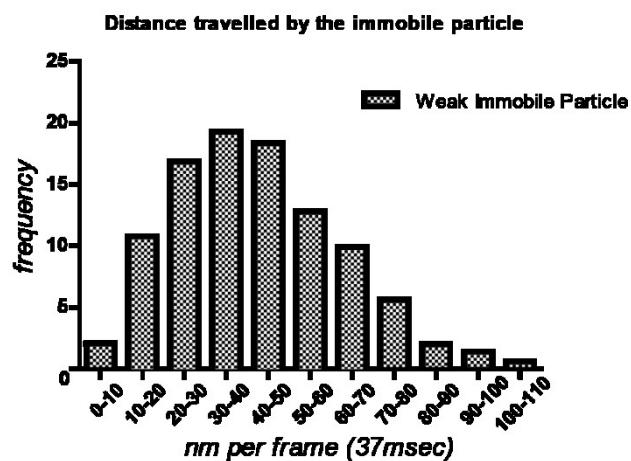
To further study the behaviour of nuclear mRNAs, we used sub-diffraction particle tracking, which allowed us to quantitatively describe the movement of mRNAs at high spatial resolution. Due to the physical properties of light, light microscopy has an optical resolution of only 200nm in the x-y plane. Although conventional light microscopy does not allow objects to be distinguished if they are less than 200nm from each other, the position of a diffraction-limited object, can be determined with much higher accuracy.

This is achieved by fitting a 2D Gaussian mask onto a signal captured by the EMCCD array of the camera, a method that is now frequently applied in super resolution microscopy approaches like PALM or STORM. We therefore analyzed our movies with a software that uses a 2D Gaussian fitting to detect mRNAs (Figure 10A), which were then further analyzed with a particle tracking algorithm. Specifically, we first detected the mRNA spots based on their radius and intensity, and then precisely localized their position by detecting the center of each spot. These coordinates were then used by a tracking algorithm that searched each mRNA spot from one frame and determined if a spot was detected in the next frame in its vicinity and then connected the two spots to create a track (see materials and methods). The software reiterated this procedure for every spot in every frame of the movie, creating tracks for all mRNAs imaged.

A



B



**Figure 10: Localization precision of our software that uses a 2D Gaussian fitting to detect mRNAs.** (A) Image taken from « Single-molecule studies of repressor–DNA interactions show long-range interactions »<sup>176</sup> showing signals of single GFP molecules with variable intensities, with a graph illustrating the intensity distribution of a spot relatively to its positions. This is on what the 2D Gaussian fitting is based. (B) Distribution showing the frequency of movements (or distance traveled) of 5 immobile particles that have a weak signal, localized and tracked with our software to test the localization precision of our tracking software.

Before analyzing our data, we first tested the localization precision of our imaging setup and analysis software i.e. the precision (in nm) by which we can localize an mRNA. To address this, we « tracked » single mRNAs in fixed cells (Fig.10B). Since the GFP signal of

single mRNAs labeled with PP7 is weak and since the localization precision of Gaussian fitting is influenced by signal intensity, we decided to image single mRNAs labeled by FISH. The FISH signals had similar intensities to single RNAs labeled with 24PP7. After image acquisition, the coordinates of each spot for each frame were determined using the spot detection software and a “track” of an immobile RNA was constructed.

We then calculated the distance traveled by this immobile particle from one frame to another and plotted the frequency distribution of distances measured, binned in 10nm intervals (Figure 10B). The first bar represents all the distances from one frame to another equal to or less than 10 nm; the second bin represents all distances between 10nm and 20nm etc. In a perfect scenario, we would expect the distance traveled from one frame to another to be equal to zero, which is never observed because of limitations in localizing the mRNA spots. We found that in 70% of the time, this particle traveled less than 50 nm and in 85% of the time, this particle traveled 60nm from one frame to another.

This indicates that the accuracy with which we could measure distances was at least 50nm. In contrast to the above scenario, mRNAs examined using live cell imaging are not static. A moving mRNA will create a slightly distorted signal that is not best fitted using a perfect 2D Gaussian mask; this, slightly affects the localization precision. Therefore, our localization precision would likely be lower than the one measured using a static particle. Nevertheless, we assumed that our mRNA localization precision was 50-60nm for all the data sets discussed in further detail below.

#### 4.1.6 Nuclear mRNAs have similar behaviours

As mentioned previously, we aimed to understand the behaviour of mRNAs in the nucleus, in particular when they are at the periphery. We therefore analyzed several movies of mRNAs (Figures 8B and 9A and B) and tracked the nuclear *GLTI* reporter, and the endogenous *CLB2* and *MDNI* mRNAs using our tracking software. Since mRNAs move within the entire nucleus, which has a spherical form, and since we acquire images in 2D, mRNAs were frequently lost from our focal plane. mRNAs diffusing by Brownian motion would, therefore, be quickly lost from the focal plane, whereas mRNAs bound to specific structures, like a nuclear pore (NPC) or chromatin, or even those diffusing within a restricted volume due to the presence of a specific microenvironment, would stay longer in the imaging plane.

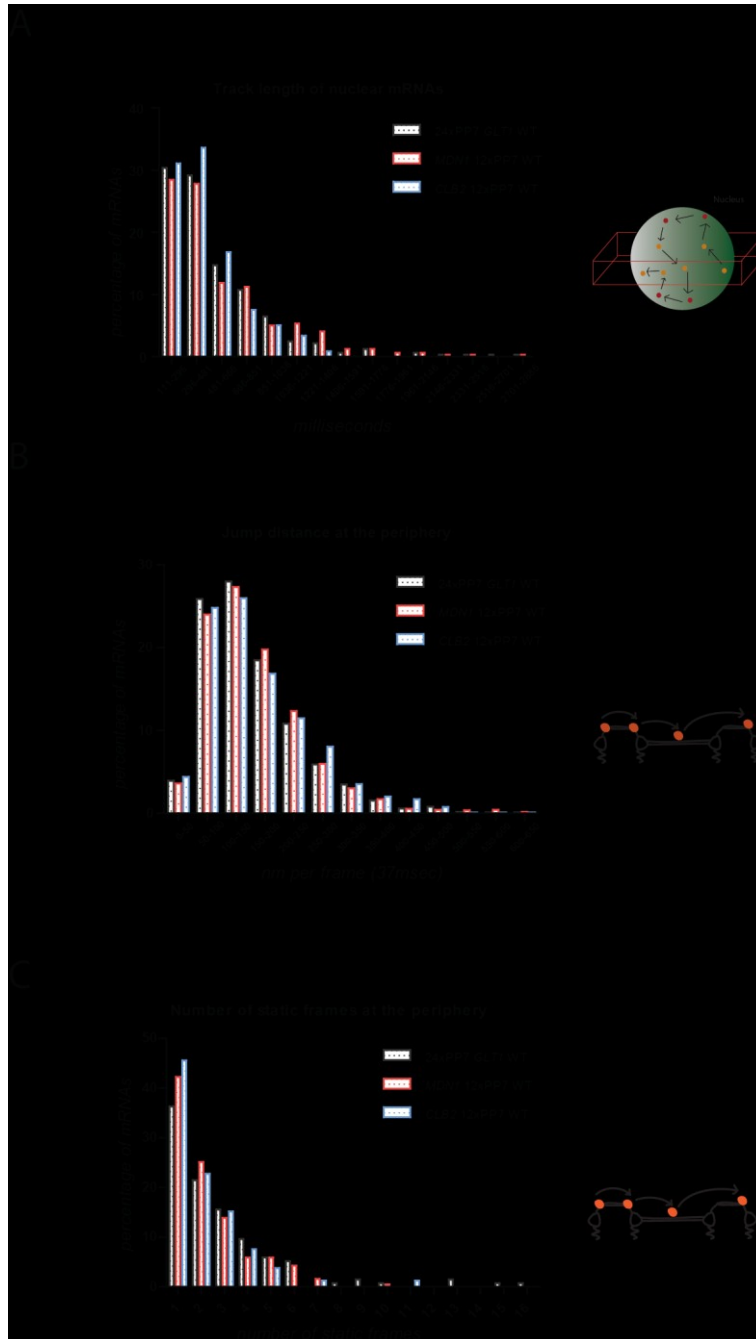
Because the tracking software could only create a track for as long as an mRNA was observed, track length (in time) was a measure of the behaviour of a nuclear RNA. For creating tracks, we used a minimum of three consecutive frames in which an mRNA was observed. Consequently, RNAs observed for less than 111ms in the focal plane were not included in our analysis. First, we analyzed the general behavior of mRNAs in the nucleus by measuring for how many frames mRNAs were observed in one plane. This gave us information about the diffusion characteristics of the mRNAs.

Figure 11A shows the frequency distribution of the observation time of individual tracks. The data was binned into 185ms segments containing 5 frames. We choose to bin the data by 185ms segments because this number (185ms) represents the time an mRNA takes to translocate through the NPC<sup>91</sup>, giving us an idea of the time mRNAs spend at the periphery or

in the nucleoplasm. As mentioned above, we chose to analyze mRNAs observed for a minimum of 111 milliseconds (corresponding to 3 frames) to facilitate tracking and reduce the noise from the spot detection software. Nuclear mRNA for all three mRNAs analyzed showed a similar behaviour. 30% of 24PP7-*GLT1* mRNAs were observed between 111ms and 296ms, and 30% between 296 and 481ms. Approximately 40% of the observed tracks were longer than 481ms, with some tracks lasting longer than one second. Such tracks were not consistent with simple diffusion and mostly came from RNAs that were observed at the nuclear periphery. Similar distributions were observed for the *CLB2* and *MDN1* mRNAs, suggesting that mRNPs might interact with some structures at the nuclear periphery.

To further characterize the « scanning » RNAs, we next determined the movement of mRNAs found at the nuclear periphery (Fig.11B). We selected tracks of RNAs located at the periphery and used the coordinates from the spot-detection and tracking software to calculate the distance that each mRNA traveled from one frame to the next. As described above, our localization precision was approximately 50nm, so we binned distances into 50nm bins and plotted the frequency of « jump » distances for the different RNAs.

We found that only 5% of 24PP7-*GLT1* mRNAs traveled between 0nm and 50nm, 26% traveled between 50nm and 100nm and 28% between 100nm and 150nm. Approximately 40% of the RNAs showed movements greater than 200nm in 37ms. Again, *CLB2* and *MDN1* mRNAs showed a similar behavior.



**Figure 11: 24PP7 *GLT1* mRNAs, *MDN1* 12PP7 and *CLB2* 12PP7 mRNAs have similar behaviors.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs are continuously in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 326 24xPP7 *GLT1* mRNAs, 321 *MDN1* 12xPP7 mRNAs and 121 *CLB2* 12xPP7 mRNAs from 20 WT cells were tracked (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 156 24xPP7 *GLT1* mRNAs, 171 *MDN1* 12xPP7 mRNAs and 104 *CLB2* 12xPP7 mRNAs from 20 WT cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of the focus. 146 24xPP7 *GLT1* mRNAs, 171 *MDN1* 12xPP7 mRNAs and 104 *CLB2* 12xPP7 mRNAs from 20 WT cells were tracked.

Lastly, we quantified the number of time frames that each mRNA becomes static while scanning the NE. This might give us information on steps/processes that may happen at the nuclear periphery, like quality control steps, and it will be more significant to see if we disrupt those steps in different mutants later. As described in the introduction, yeast NPC's have a diameter of 95nm-100nm and a nuclear basket length of approximately 95nm. Moreover, Winey et al showed that the average distance between two adjacent NPCs is approximately 240nm<sup>177</sup>. Therefore, we defined a static mRNA as an mRNA that travels less than 100nm (i.e. less than the diameter of the pore and the length of the basket) from one frame to another (37ms) before going out of focus.

As shown in Figure 11C, 37% of 24PP7-*GLT1* mRNAs in WT cells were static only once (for 37ms) from the time we first saw them until they went out of the plane of focus. 21% were static for two frames and 15% were static for three frames. Similar frequencies were observed for the *CLB2*-12PP7 and the *MDN1*-12PP7 mRNAs.

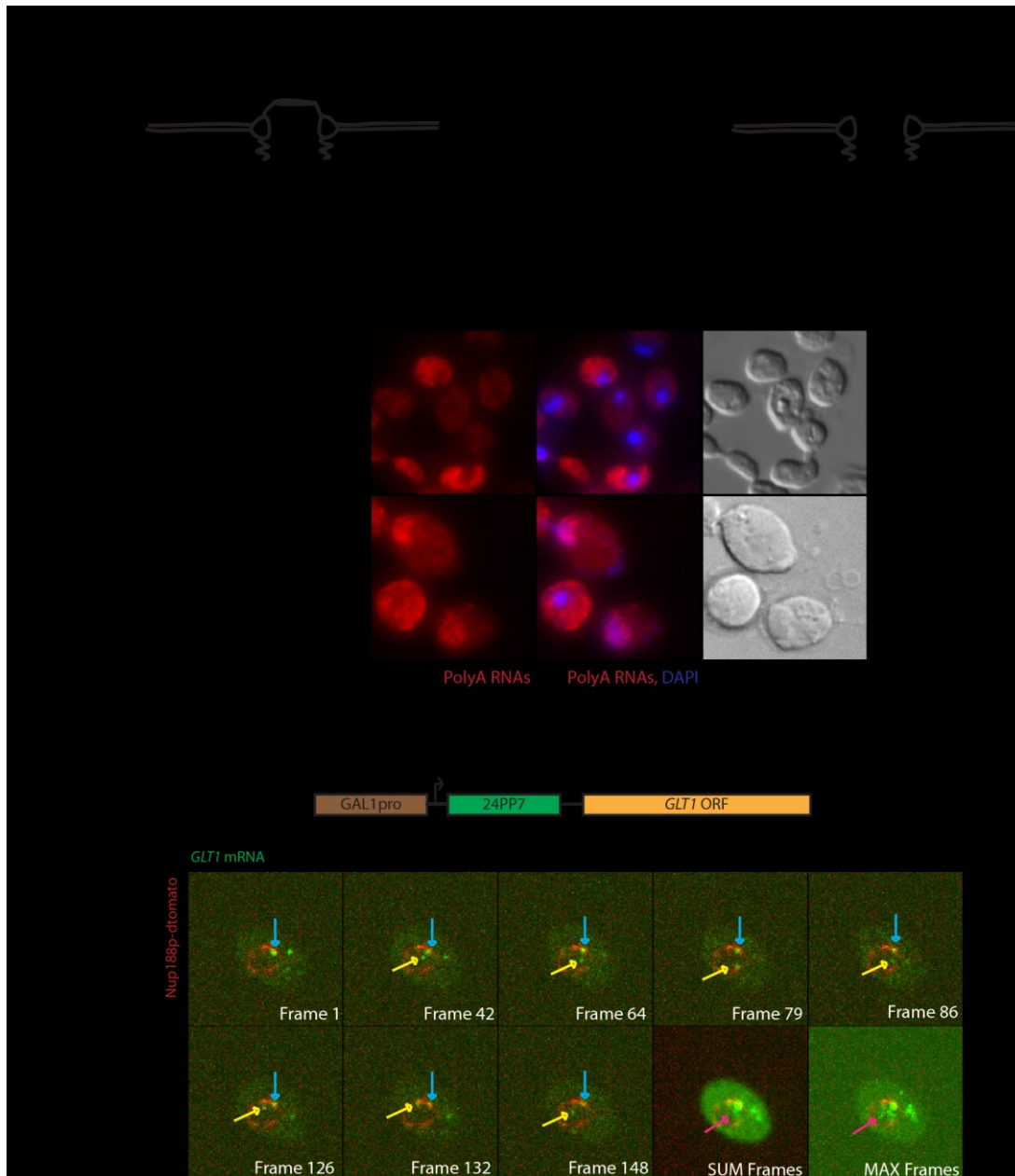
Taken together, these results show that all three mRNAs studied so far behaved similarly. Importantly, the number of PP7 repeats (whether 12PP7 or 24PP7), their insertion site (at the 5' or at the 3' end of the mRNA) as well as the size of the mRNA (notably, the *MDN1* gene is ~14Kb long, the *CLB2* gene is ~1.5Kb long and the *GLT1* gene is ~6Kb long), do not have any effects on the general mRNA behaviour in the nucleus. Therefore, we chose to use the 24PP7-*GLT1* mRNA under the *GALI* promoter to further study the mRNA behaviour in several mutant yeast strains, until told otherwise stated.

#### 4.1.7 What mediates mRNA scanning along the nuclear envelope?

In the previous section we found that different mRNAs scan along the nuclear periphery. The questions that emerge from these results are: What helps mRNAs scan the nuclear periphery and what keeps them there? As mentioned in the introduction, one of the first structures, which mRNPs encounter at the periphery, is the nuclear basket. Previous work from the Rout group has shown that Mlp1p and Mlp2p are the main structural components of the nuclear basket and, that Mlps interconnect the pores<sup>110</sup> (Fig.4). We hypothesized that Mlps are involved in mRNP scanning at the periphery. Therefore, we deleted the non essential *MLP1* and *MLP2* genes and investigated whether mRNA scanning was affected in this strain.

We first tested the effect of the *MLP1/2* double deletion on the export of total mRNAs by FISH using probes that hybridized to the polyA tail of RNAs (Fig.12B). In WT cells, bulk mRNA was located mainly in the cytoplasm; a very weak signal was detected in the nucleus. In  $\Delta mlp1/2$  cells, we similarly saw most polyA signal in the cytoplasm, but detected weak accumulation of polyA RNAs in the nucleus, consistent with previous reports<sup>164</sup>. This suggests that Mlp1p/Mlp2p and the nuclear basket have some role in the export of polyA RNAs, but are not essential for this process, as most mRNAs are still exported to the cytoplasm.



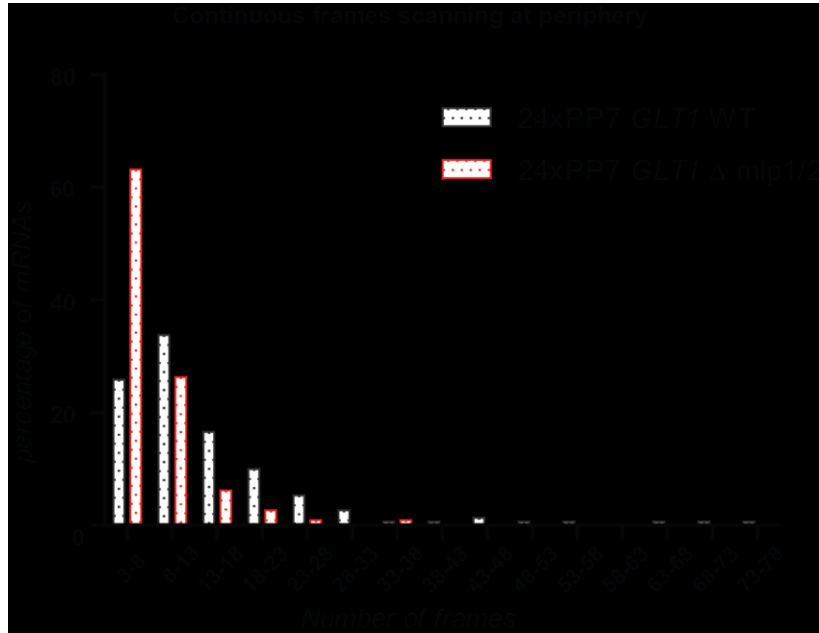


**Figure 12: Deleting the Mlps causes nuclear accumulation of polyA mRNAs and abolishes scanning at the nuclear periphery.** (A) Cartoon illustrating the effect on the pore structure after deleting the Mlp proteins. (B) PolyA mRNA FISH showing weak nuclear polyA RNA accumulation when deleting *MLP1/2*. Cells were grown at 30°C in YPD before fixation and hybridized with DyLight594 (equivalent of cy3.5) labeled oligo dT probes. PolyA RNAs is shown in red and DNA is stained in blue (DAPI). (C) Images of different frames of a movie showing the behavior of the transcription site (blue arrow) and single 24PP7-*GLT1* mRNA (yellow arrow) in  $\Delta mlp1/2$  cells imaged at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope is stained in red by tagging Nup188p with dtomato and the PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 148 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 148 frames.

Next, we looked at the behaviour of single 24PP7-*GLT1* mRNAs in  $\Delta mlp1/2$  cells in real time. As mentioned previously, Nup188p was tagged with a red fluorescent protein to outline the nuclear periphery. As shown in Figure 12C, after induction of transcription with galactose, a transcription site was visible at the periphery of the nucleus (blue arrow, frame 1). In frame 42, a single mRNA (yellow arrow) was released from the site of transcription and was first found at the periphery in frame 79. In contrast to what we observed in a WT strain, the mRNA did not scan the nuclear periphery for a prolonged period of time, but was quickly released back into the nucleoplasm (frame 86 and 126). The MAX projection shows the path of the mRNA illustrating that the mRNA was not able to scan like in a WT cell, but frequently went back to the nucleoplasm. This is further shown in the SUM projection image (magenta arrow); the diffuse signal in the nucleoplasm demonstrates that the mRNAs were diffusing freely in the nucleus and were not held at a specific place at the periphery for longer periods of time. These results suggest that the Mlp1p and Mlp2p proteins are required for scanning, and may play a role in keeping mRNPs at the periphery.

To describe this behaviour in a more quantitative manner, we compared the number of continuous frames in which 24PP7-*GLT1* mRNAs are scanning the periphery before being either released back into the nucleoplasm or being exported to the cytoplasm in both WT and  $\Delta mlp1/2$  cells (Figure 13A). In WT cells, we found that 25% of mRNAs scanned the nuclear periphery for 3 to 8 consecutive frames (111 to 296ms) and 35% of mRNAs scanned between 8 and 13 frames (296 to 481 ms). The remaining mRNAs scanned for longer periods of time that lasted for a maximum of 2886ms. However, as shown in fig 12C and in supplementary movie 4, in  $\Delta mlp1/2$  cells mRNAs were retained at the periphery for very short times; 60% of mRNAs scanned between 11 and 296ms and only 30% of mRNAs scanned between 296ms

and 481ms (Figure 13A). These results suggest that in the absence of Mlps, mRNAs cannot scan as efficiently as in a WT cell. We propose a role for the Mlps and the nuclear basket in holding mRNAs at the periphery.



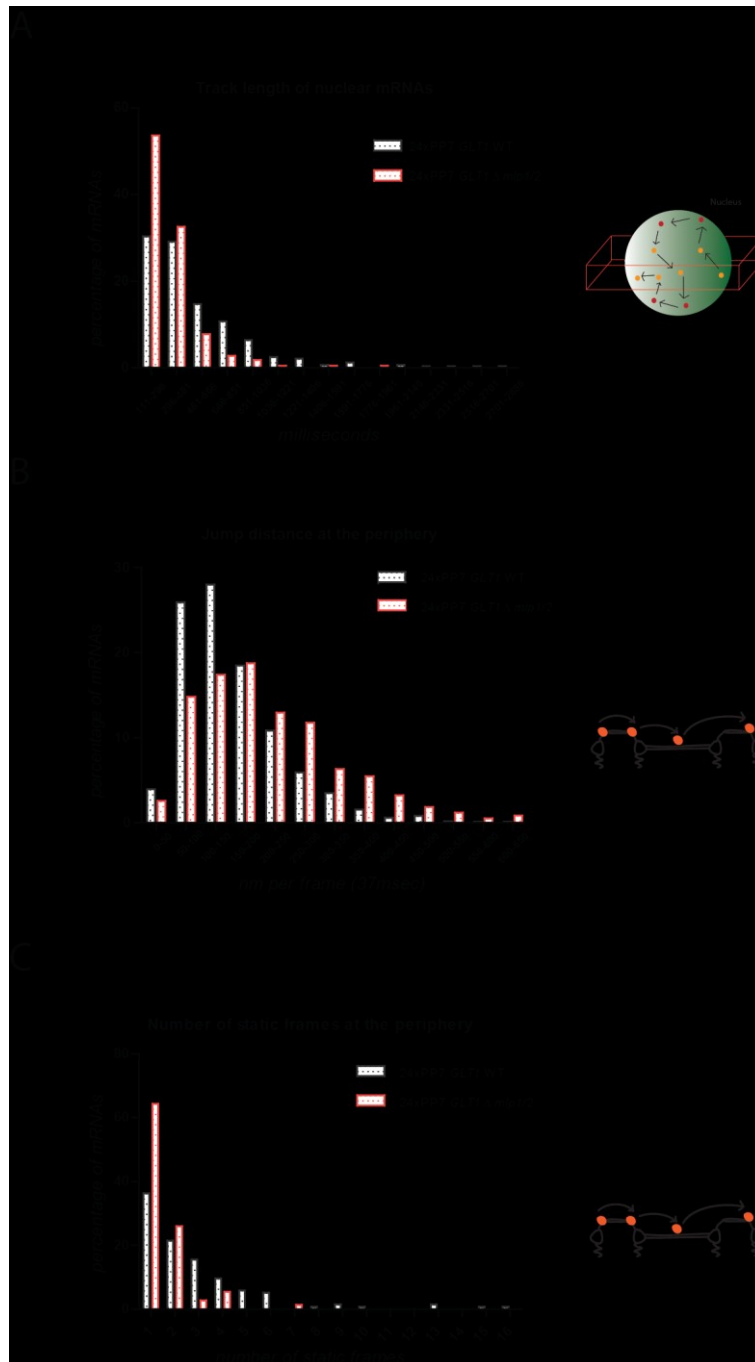
**Figure 13: mRNAs scanning at the periphery is abolished when Mlp proteins are deleted.** Frequency distribution of the number of frames mRNAs continuously scan at the periphery. 146 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 WT cells and 105 24PP7-*GLT1* mRNAs from 20  $\Delta mlp1/2$  cells were tracked.

Next, we analyzed the effect of deleting the Mlps on the behaviour of nuclear mRNAs. We first determined for how many frames mRNAs remained in a focal plane before going out of focus (Figure 14A). We observed a higher frequency of mRNAs for shorter periods (between 111 and 296ms as well as between 296ms and 481ms) in  $\Delta mlp1/2$  cells compared to WT cells: 50% for  $\Delta mlp1/2$  cells and 30% for WT cells. Interestingly, in  $\Delta mlp1/2$  cells, only a

very small portion of mRNAs spent more than 481ms in the focal volume, further suggesting that Mlp proteins and the basket have an effect on the diffusion of nuclear mRNAs.

Subsequently, we analyzed the distances traveled by the mRNAs when located at the periphery (Figure 14B). We saw a decrease in the percentage of mRNAs that moved between 50 and 100nm and between 100nm and 150nm, and more mRNAs moving longer distances (from 200nm to 650nm) in 37ms when found at the periphery in  $\Delta mlp1/2$  cells. The 150nm-200nm and 200nm-250nm bins remain unchanged. These results suggest that the Mlps and the nuclear basket influence the jump distance of mRNAs at the periphery, possibly by providing docking sites that keep mRNAs restrained for prolonged periods of time.

Lastly, we examined the number of times that mRNAs became static when they are at the periphery, i.e. moving less than 100nm from one frame to the next (Fig.14C). Importantly, we saw a large increase in the frequency of mRNAs « static » once in  $\Delta mlp1/2$  cells compared to WT cells (65% of mRNAs in  $\Delta mlp1/2$  cells and only 37% of mRNAs in WT cells were static for a single frame. In addition, 85% of mRNAs were static for 1-2 frames (up to 74ms) in  $\Delta mlp1/2$  cells compared to WT (~57% for mRNAs in WT cells). These results suggest that in the absence of the nuclear basket and the Mlp proteins, mRNAs diffuse more freely in the nucleoplasm and at the nuclear periphery. Moreover, in the absence of the basket, mRNAs becomes less static at the periphery, which suggests that there are one or more processes occurring at this site, which influence the mobility of RNAs in an Mlp-dependent manner.

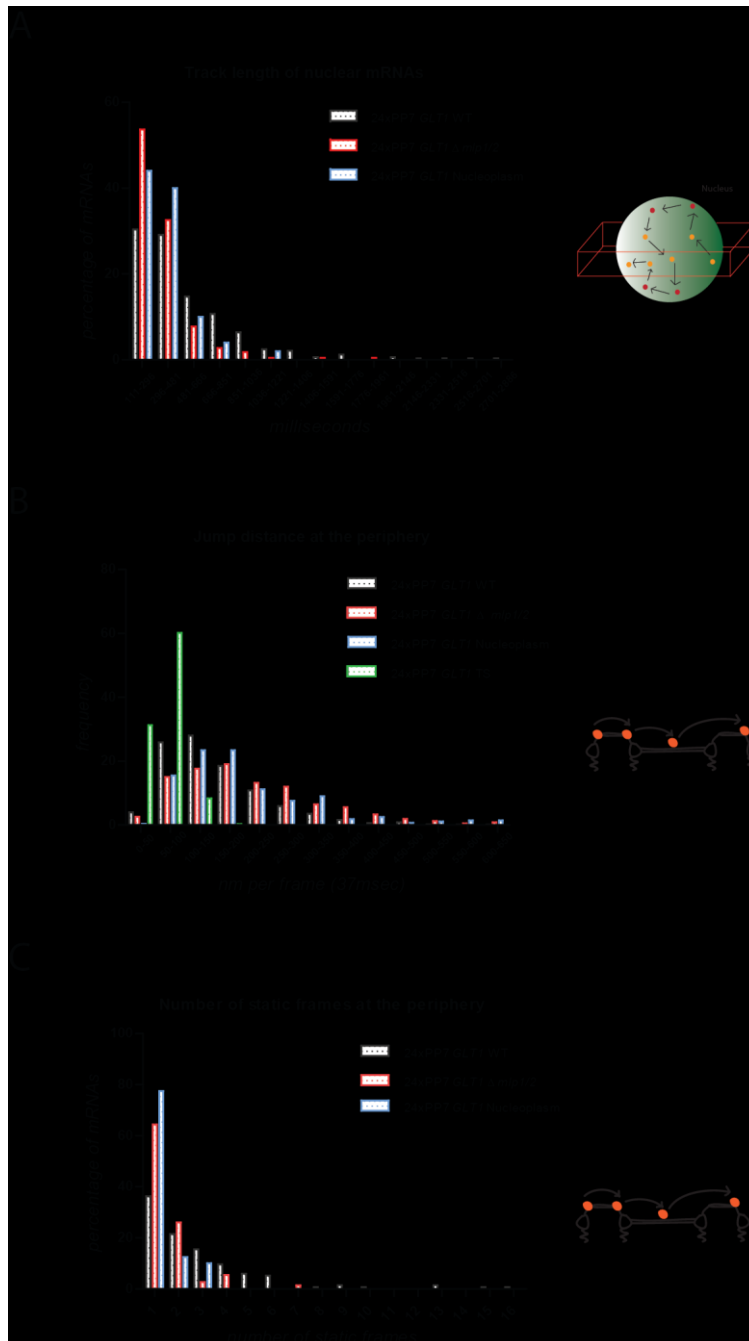


**Figure 14: Losing the Mlps and the nuclear basket affects the behaviour of nuclear mRNAs.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs are continuously in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 218 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta mlp1/2$  cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 105 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta mlp1/2$  cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of the focus. 93 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta mlp1/2$  cells were tracked.

#### 4.1.8 In the absence of Mlps, mRNAs at the periphery behave similar to free nucleoplasmic mRNAs

To better understand the dynamics of mRNAs at the periphery, we compared the behaviour of mRNAs found at the periphery to the behaviour of nucleoplasmic mRNAs, which are thought to move freely (not attached to static structures) once released from the transcription site. We first examined the behaviour of nucleoplasmic 24PP7-*GLT1* mRNAs in a WT strain and determined for how many frames mRNAs were observed in the focal plane and compared it to all nuclear mRNAs (nucleoplasmic and peripheral) in WT and in  $\Delta mlp1/2$  cells (Figure 15A). Interestingly, we found that the nucleoplasmic mRNAs in WT cells behaved very similarly to the total nuclear mRNAs in  $\Delta mlp1/2$  cells: 45% of nucleoplasmic mRNAs were observed between 111ms and 296ms and approximately 40% were seen between 296ms to 481ms. Determining jump distances of nucleoplasmic mRNAs revealed a similar behaviour of mRNAs at the periphery in  $\Delta mlp1/2$  cells (Figure 15B). The only difference was that we found very few nucleoplasmic 24PP7-*GLT1* mRNAs moving between 0nm and 50nm in 37ms.

As mentioned in the introduction, Nehrbass et al showed that 71% of *GALI* transcription sites are found at the periphery when active, similar to what we found for the *GAL1-24PP7-GLT1* locus<sup>150</sup>. As *GAL* loci are thought to be attached to a nuclear pore, the locus should therefore be immobile. To examine the behaviour and the distances traveled by a locus at the periphery, we choose to only analyze transcription sites found at the nuclear periphery. When we calculated the distances traveled by *GALI* transcription sites within 37ms, we observed a very different type of behaviour compared to mRNAs at the periphery.



**Figure 15: mRNAs at the periphery behave similarly to mRNAs in the nucleoplasm when Mlp proteins are deleted.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs are continuously in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 52 24xPP7 *GLT1* nucleoplasmic mRNAs from 20 WT cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances nucleoplasmic mRNAs travel when in the nucleoplasm in 37ms (for 24PP7-*GLT1* nucleoplasmic mRNAs only). 52 24xPP7 *GLT1* nucleoplasmic mRNAs from 20 WT cells and 4 GAL1p-24PP7-*GLT1* peripheral transcription sites from 4 cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) in the nucleoplasm (for 24PP7-*GLT1* nucleoplasmic mRNAs only) before going out of the focus. 40 24xPP7 *GLT1* nucleoplasmic mRNAs from 20 WT cells were tracked.

Notably, we found that 33% of the time, *GALI* transcription sites at the periphery moves between 0nm and 50nm. Furthermore, 60% of the time *GALI* transcription sites move between 50 and 100nm. As mentioned before, we defined as static, movements occurring over distances less than 100nm over the course of 37ms. This distance corresponds to the diameter of the nuclear pore and to the length of the basket, both of which are approximately 100nm<sup>177</sup>. Since the *GALI* transcription sites are attached to the periphery, we expected that the majority of the time, the transcription sites would move less than 100nm. Indeed, our data show that 93% of the time, the transcription sites move less than 100nm or are static (according to our criteria).

With this in mind, we finally looked at the number of static frames for nucleoplasmic 24PP7-*GLT1* mRNAs and compared this to the number of static frames for 24PP7-*GLT1* mRNAs at the periphery in WT and in  $\Delta mlp1/2$  cells (Figure 15C). We observed a similar behaviour for 24PP7-*GLT1* nucleoplasmic mRNAs and 24PP7-*GLT1* mRNAs found at the periphery in  $\Delta mlp1/2$  cells. These results suggest that at the periphery in WT cells, the mRNA behaviour changes compared to when it is in the middle of the nucleus. These results suggest that nucleoplasmic mRNA behaviour changes at the nuclear periphery in an Mlp-dependent way.

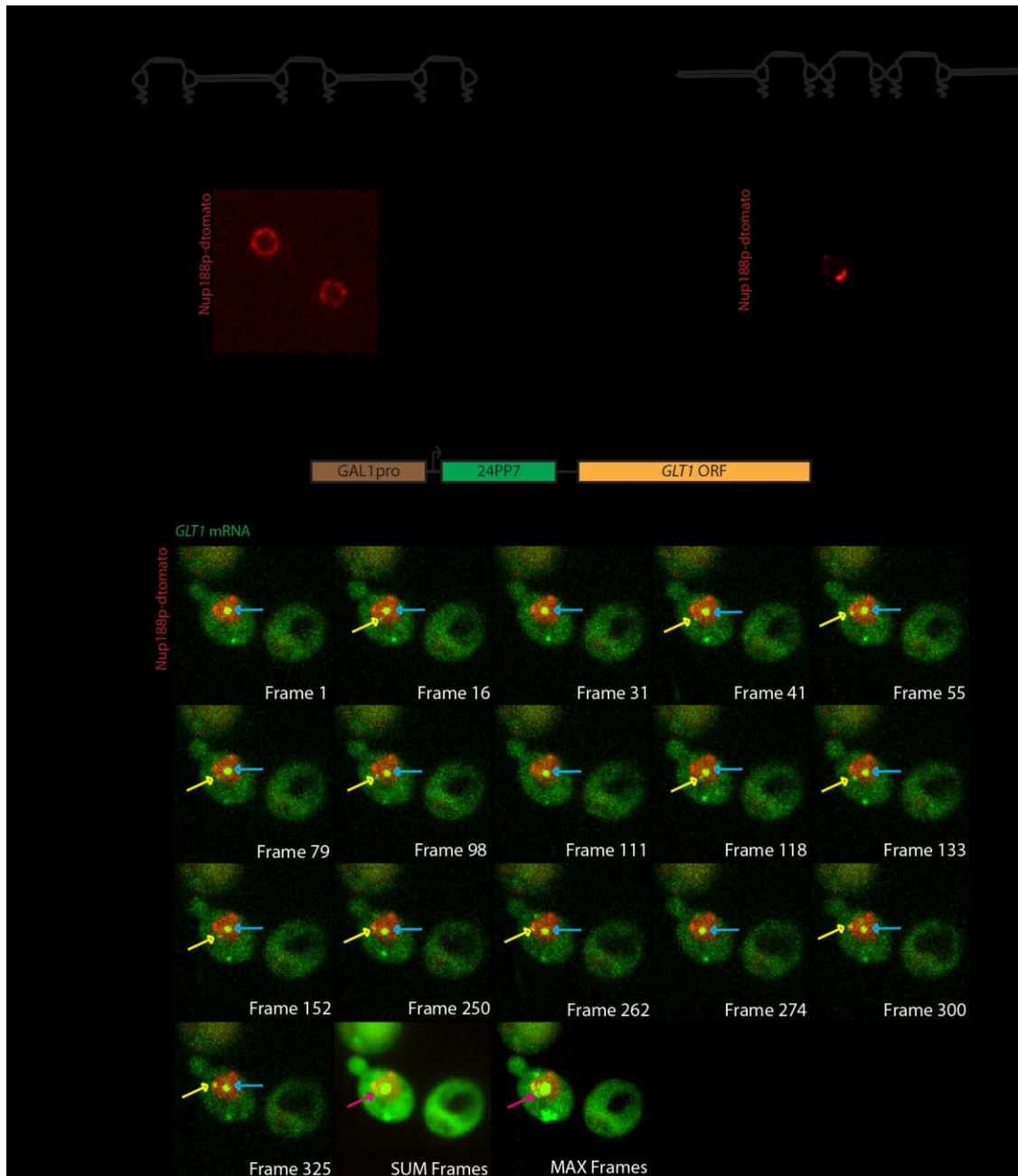


#### **4.1.9 mRNAs scan the nuclear envelope in an NPC-independent manner**

Niepel and co-workers have suggested that the MLPs not only form the nuclear basket but are also implicated in connecting different NPCs<sup>110</sup>. This was partially based on earlier observations that in mutant strains, where pores cluster in a few areas of the nuclear envelope, MLPs only partially colocalize with these cluster and partially maintain a peri-nuclear staining<sup>104</sup>. To determine whether non NPC attached Mlp proteins could be implicated in mRNP scanning, we studied the behaviour of 24PP7-*GLT1* mRNAs in an NPC clustering mutant strain ( $\Delta nup133$  (301-1157)). We chose to analyze a mutant strain that contains a partial deletion of Nup133, which has a strong clustering phenotype, that causes aggregation of the nuclear pores in one or two places on the NE.

To simultaneously see the clustered nuclear pores and the outlines of the nuclear periphery, we tagged Nup188p with a red fluorescent protein and simultaneously transformed a plasmid expressing NLS-2xcherry protein. We then added galactose to induce the transcription of the 24PP7-*GLT1* gene.

As shown in frame 1 of Figure 16B, we observed a transcription site in the nucleus but not at the periphery, indicating that pore clustering affects the interaction of the transcription site with the nuclear periphery. In frame 16, a single mRNA became visible and, interestingly, stayed at the periphery for a considerable amount of time, scanning the nuclear periphery in an area outside of the pore clusters (frames 41, 79 and 98).

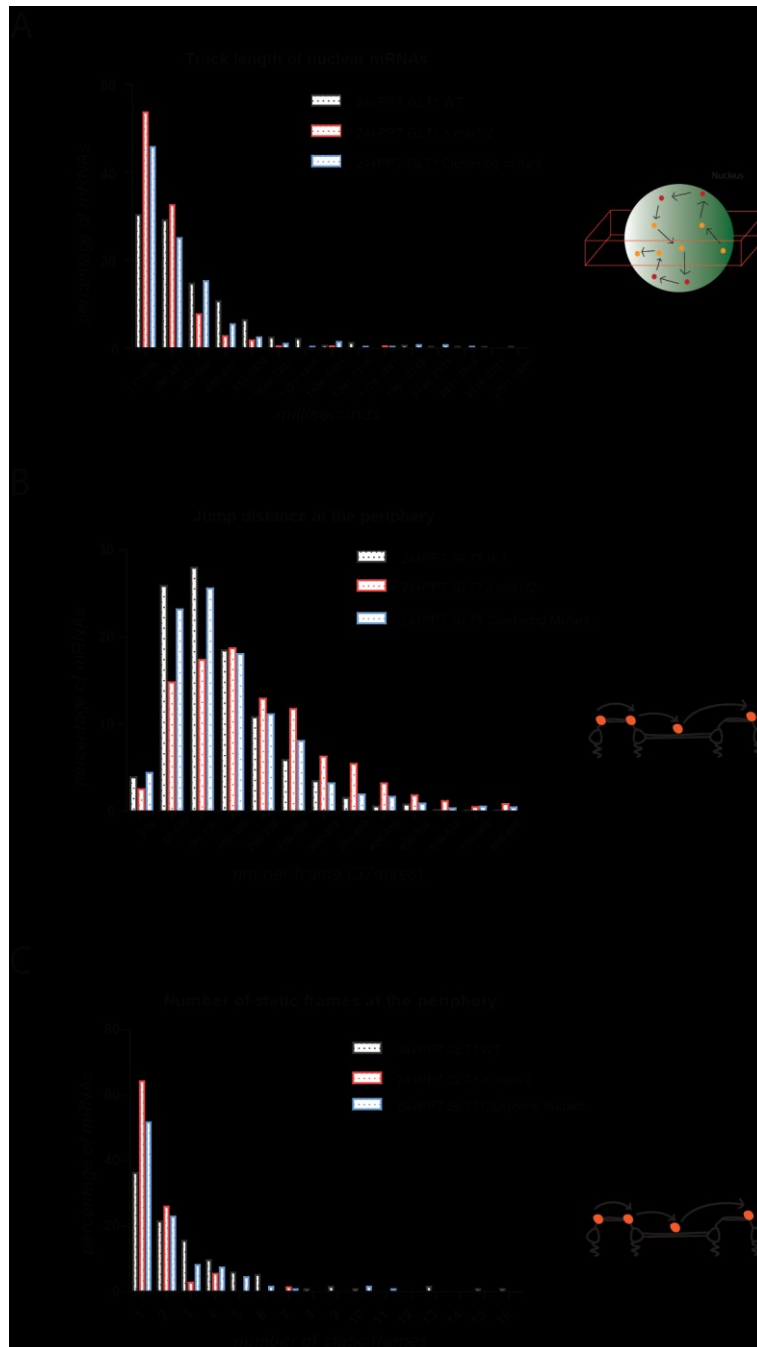


**Figure 16: 24PP7-GLT1 mRNA still scans the periphery in a clustering mutant.** (A) Cartoon and image comparing the pores distribution on the nuclear envelope in a WT cell and a clustering mutant ( $\Delta nup133$  (301-1157)). The pores (WT) and pore clusters (mutant) are stained in red by tagging Nup188p with dtomato (B) Images of different frames of a movie showing the behavior of the transcription site (blue arrow) and single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrow) in  $\Delta nup133$  (301-1157) cells imaged at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 25°C before induction with galactose. The pore clusters are stained in red by tagging Nup188p with dtomato, the inside of the nucleus is stained in red by transforming the NLS-2xmCherry plasmid and the PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 325 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 325 frames.

The mRNA went out of focus in frame 111 and came back shortly thereafter in frame 118 where it scanned at a cluster of pores (frames 300 and 325). These results suggest that mRNAs scan the NE in an Mlp1/2 dependent but in a NPC-independent fashion.

To better understand this phenomenon, we analyzed the diffusive behaviour of 24PP7-*GLT1* mRNAs in the clustering mutant. Figure 17A shows that the continuous residence time in the focal volume was different in the clustering mutant than in the WT or in the  $\Delta mlp1/2$  double mutant and showed an intermediate phenotype. On the other hand, jump distances at the periphery were very similar in the clustering mutant and in the WT (Figure 17B).

The number of static frames also showed an intermediate phenotype, with more single static frames observed in the clustering mutant than in the WT strain (Fig 17C). This intermediate behaviour of the clustering mutant further suggests that the presence of Mlp proteins outside the pore influences the scanning behaviour of mRNAs at the periphery.

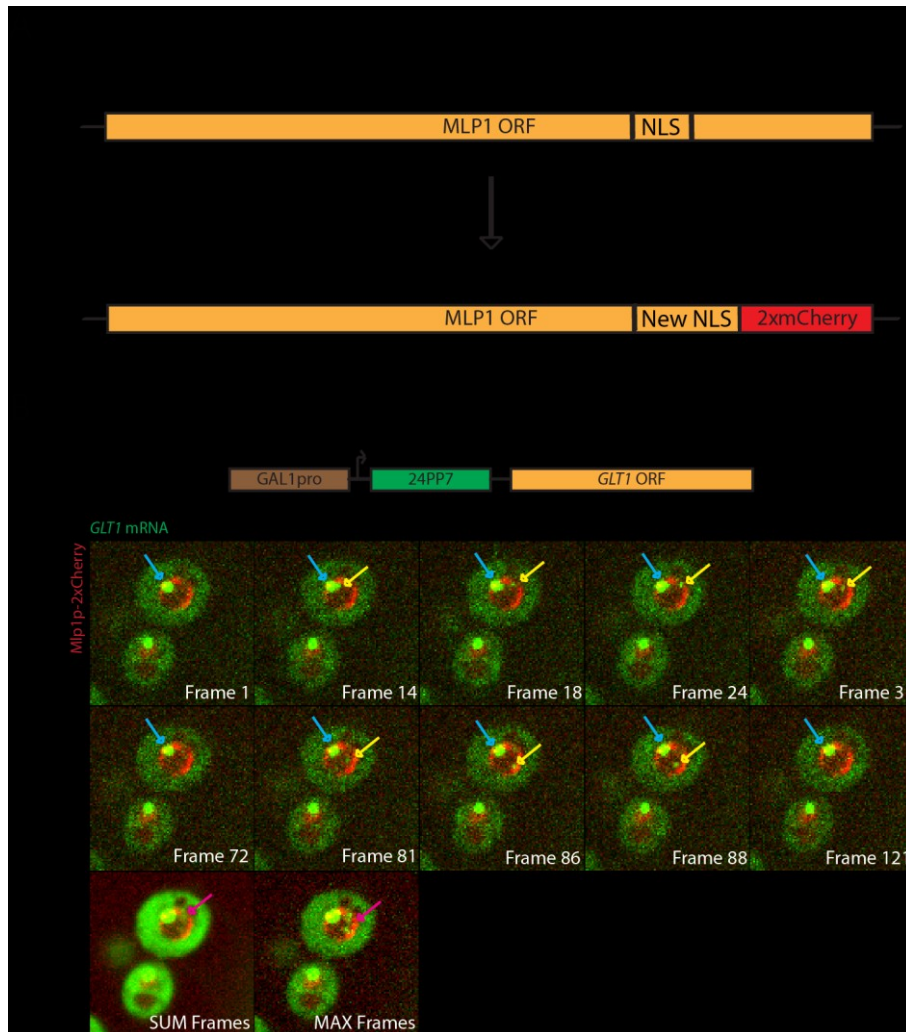


**Figure 17: The behavior of mRNAs in a clustering mutant and a  $\Delta mpl1/2$  strain are similar.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs are continuously in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 285 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 « clustering mutant » cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 175 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 « clustering mutant » cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of focus. 135 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 « clustering mutant » cells were tracked.

#### 4.1.10 The C-terminus of Mlp1p is required for mRNA scanning

Having established a role for Mlp proteins in mRNA scanning at the nuclear periphery, we determined which domain of this protein is required for scanning. As mentioned in the introduction, Mlp1p is anchored to the pore via its interaction with Nup60p (a nuclear pore protein)<sup>110,178</sup>. Deletion of *NUP60* causes Mlp1p to accumulate in the nucleoplasm instead of localizing to the periphery<sup>110,113,115,116,134</sup>. Furthermore, Mlp1p is tethered to the pore via its N-terminal domain<sup>110</sup> while its C-terminal domain contains an NLS sequence, which was shown to interact with the polyA RNA binding protein Nab2p<sup>109,128</sup>.

Therefore, we decided to analyze nuclear mRNA behaviour in a *NUP60* deletion strain, a strain where the the C-terminal part of Mlp1p was deleted and in another strain containing a point mutation in the Nab2 protein (Nab2 F73D), previously shown to abolish the interaction between Nab2p and the C-terminus of Mlp1p<sup>133</sup>. We first constructed a strain lacking the C-terminal region of Mlp1 using homologous recombination in yeast, and exchanged the C-terminal domain of Mlp1p starting at position 4470 and replacing this region by a different NLS sequence followed by 2xmCherry (Fig 18A). Adding the mCherry proteins allowed us to verify that this protein was correctly localizing to the nuclear periphery. To introduce a the *NAB2* F73D mutation, we first created a plasmid containing a region of the *NAB2* gene, introduced the point mutation using PCR, and then used homologous recombination to insert this point mutation in the endogenous locus (See material and methods for further details).



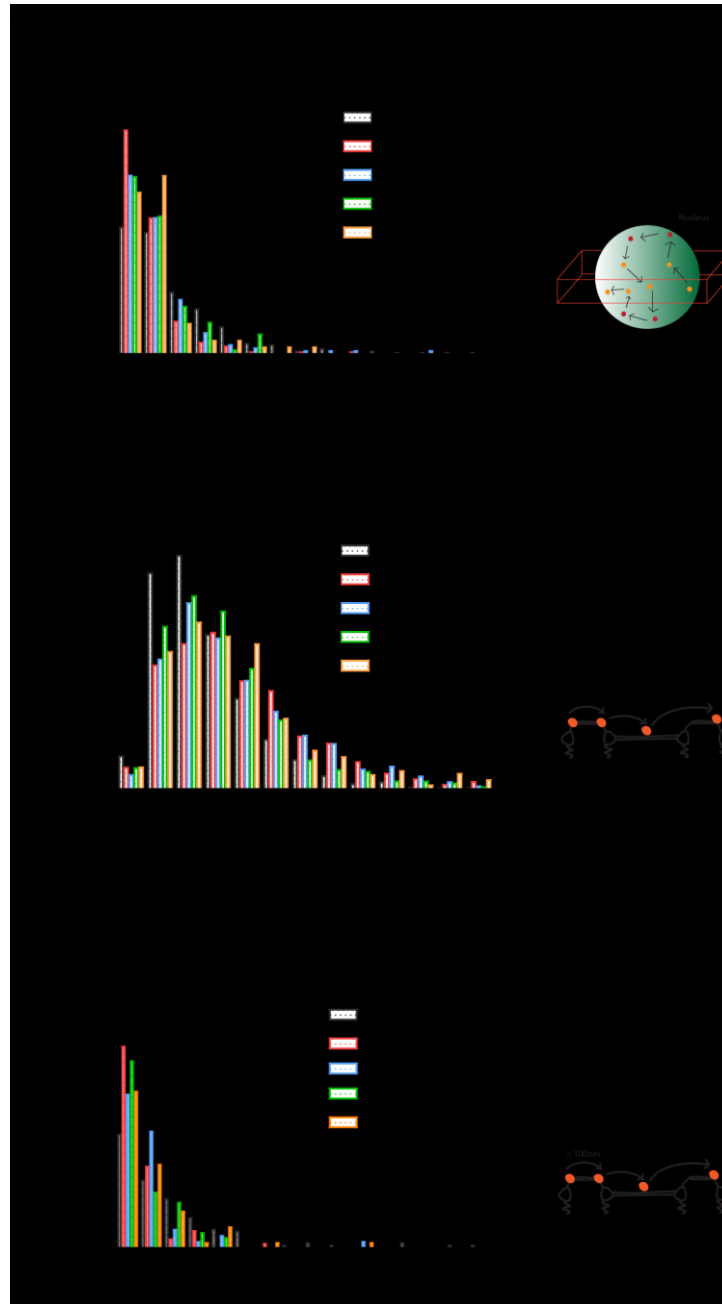
**Figure 18: 24PP7-*GLT1* mRNAs are not able to scan the nuclear periphery after deleting the C-terminal of Mlp1p.** (A) Cartoon illustrating how the strain where the C-term and NLS of Mlp1p (starting from position +4470bp after the ATG) is exchanged at by a new NLS sequence and a 2x-mCherry sequence was created. (B) Images of different frames of a movie showing the behaviour of the transcription site (blue arrow) and single 24PP7-*GLT1* mRNA (yellow arrow) in  $\Delta$ C-term *mlp1* cells imaged at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope is stained in red by tagging *MLP1*  $\Delta$ C-term with 2xmCherry and the PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 121 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 121 frames.

*In vivo* imaging of 24PP7-*GLT1* mRNAs in the  $\Delta$ *nup60* strain and in the Mlp1p's C-term deletion strain showed a similar phenotype as the  $\Delta$ *mlp1/2* strain. In both of these strains, mRNAs were not able to scan the nuclear periphery (see supplementary figure 2 and movie S2). However, somewhat unexpectedly, in a *nab2F73D* mutant strain, in which the interaction

between Nab2p and the C-terminus of Mlp1p was disrupted, we frequently observed scanning mRNAs (Supplementary figure S3).

After quantifying those images we found that in the  $\Delta nup60$  and  $\Delta C$ -terminal Mlp1p strain, the mRNAs diffusive behaviour was similar to each other and exhibited an intermediate phenotype compared to the WT and the  $\Delta mlp1/2$  double mutant, resembling more the phenotype of the clustering mutant (Figure 19A). However, the jump distances at the periphery as well as number of static frames observed in the  $\Delta nup60$  and in the  $\Delta C$ -terminal Mlp1p mutants were very similar to the  $\Delta mlp1/2$  double mutant, consistent with the known role of Nup60p in anchoring Mlp1 and with the known role of the C-terminus of Mlp1p in interacting with mRNPs (Fig 19B). Interestingly, although the *nab2-F73D* mutant was still able to scan the nuclear periphery, mRNAs travel distances at the periphery were similar to mRNA travel distances observed in the absence of Mlps.

Finally, the number of static frames when mRNAs are found at the periphery was different for mRNAs tracked in  $\Delta C$ -terminal Mlp1p and *nab2F73D* cells compared to mRNAs static frames observed in  $\Delta mlp1/2$ . Together, these results suggest that scanning requires Mlp1p and more precisely, the C-terminal part of Mlp1p. Furthermore, the scanning behaviour of mRNAs is not mediated by the interaction between Nab2p and C-terminus of Mlp1p, suggesting that there is another RNA binding protein that helps mRNAs scan in an Mlp1p dependent fashion.



**Figure 19: The C-terminal of Mlp1p is crucial for maintaining mRNAs at the periphery.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs continuously observed in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 138 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ C-term *mlp1* cells, 106 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ *nup60* cells, 124 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 *nab2F73D* cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 75 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ C-term *mlp1* cells, 76 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ *nup60* cells, 85 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 *nab2F73D* cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of the focus. 51 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ C-term *mlp1* cells, 62 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta$ *nup60* cells, 60 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20 *nab2F73D* cells were tracked.

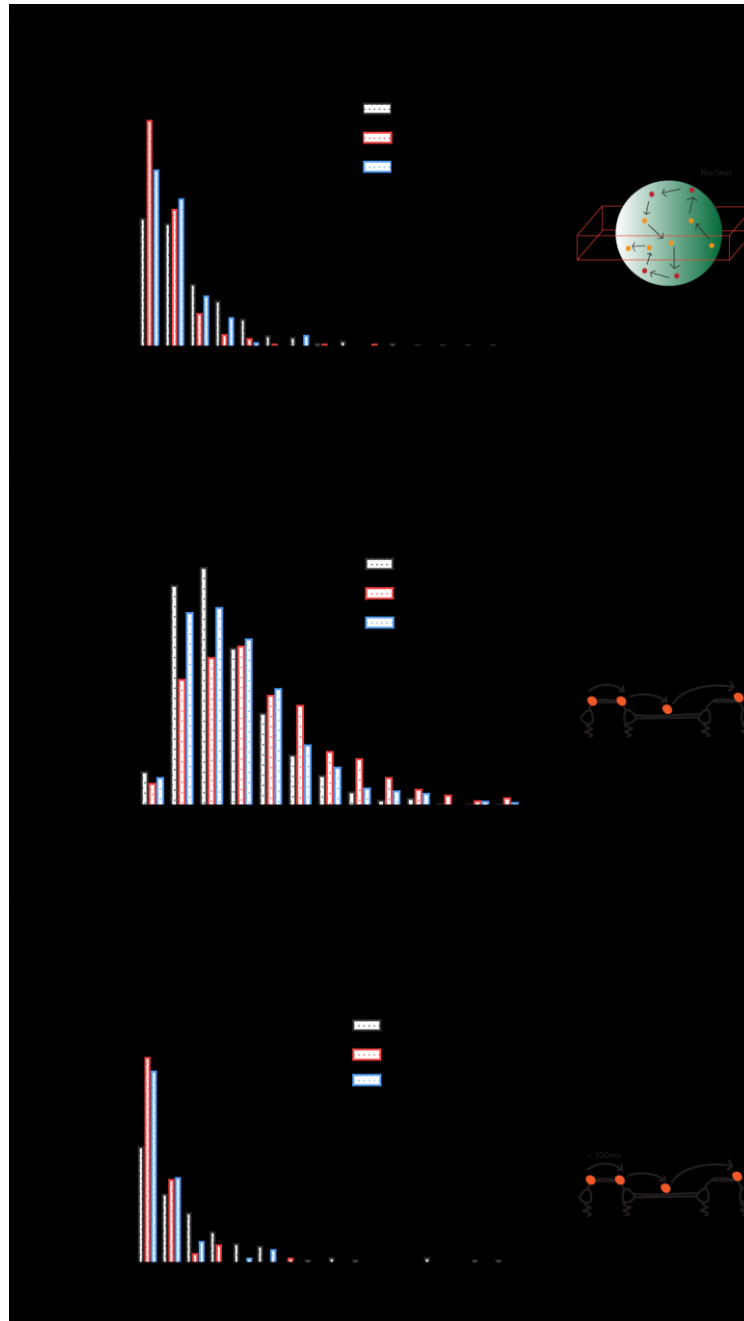


### 4.1.11 mRNAs stop at the periphery to allow Tom1p to ubiquitinate Yra1p

After showing which domain of Mlp1p is important for scanning, we wanted to understand the role of this factor. It is known that mRNA export factors Yra1p, Mex67p and Nab2p form a trimeric complex when bound to the mRNA<sup>119</sup>. However, for an mRNA to be able to get exported, Yra1p has to be released from the mRNA in a Tom1p-dependent manner (Tom1p ubiquitinates Yra1p)<sup>119</sup>.

Observing movies of mRNAs in  $\Delta tom1$  cells shows mRNAs scanning similarly to mRNAs in WT cells (Supplementary figure S4 and Movie S4). After analyzing the movies using the particle tracking software, we looked at the general diffusive behaviour of the mRNAs (Figure 20A). mRNAs in  $\Delta tom1$  cells have different diffusive behaviour compared to mRNAs in WT cells. In particular, there was a higher percentage of mRNAs observed between 3 and 8 frames in  $\Delta tom1$  cells than in WT cells.

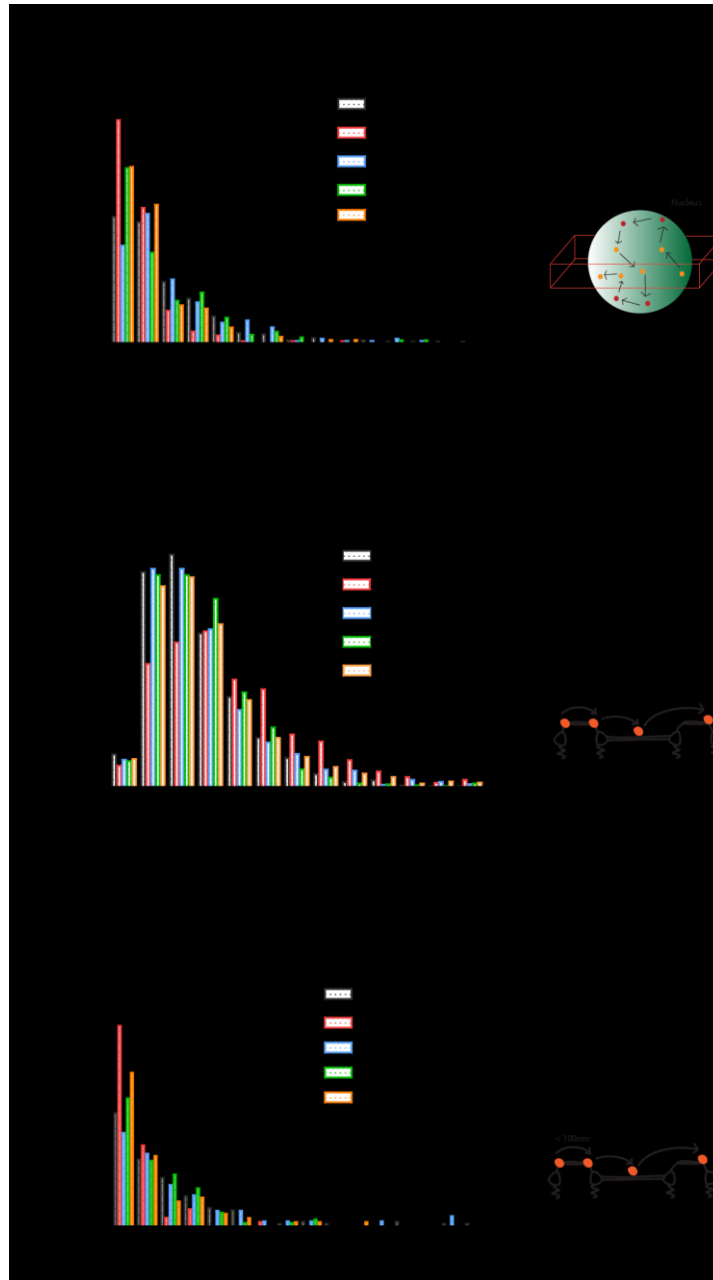
Furthermore, the distances traveled from one frame to another were similar to mRNAs in WT cells (Figure 20B). Interestingly, when looking at number of static frames when mRNAs are at the periphery, we observed a similar behaviour for mRNAs in the absence of *TOM1* as in the absence of the Mlp proteins (Figure 20C). These results suggest that Tom1p does not have any effect on the capacity of mRNAs to scan. However, our results also show that mRNAs become static when located at the periphery and we speculate that this pause allows Tom1p to ubiquitinate Yra1p.



**Figure 20: Deleting *TOM1* causes mRNAs to be more mobile at the periphery, similarly to *MLP1/2* deletion.** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs are continuously in one focal plane in the nucleus before going out of the focus. 117 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta tom1$  cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 95 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta tom1$  cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of the focus. 75 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta tom1$  cells were tracked.

#### 4.1.12 mRNAs do not scan for quality control purposes involving Sto1p, Pml1p and Pml39p

Since different mRNAs (e.g. *CLB2*, *MDN1* and the *GLT1* reporter) scan in a Mlp1 dependant fashion, and since the Mlps have been shown to have a role in quality control<sup>114</sup>, we asked whether scanning has evolved as a way to control the quality of the mRNA prior to export. To address this question, we looked at the behavior of 24PP7-*GLT1* mRNAs after deleting Sto1p (Subunit of the cap binding complex), Pml1p (Subunit of the REtention and Splicing complex, required for nuclear retention of unspliced pre-mRNAs), and Pml39p (shown to interact with Mlps and to help maintaining unspliced mRNAs in the nucleus). After observing mRNA behaviours in these background strains, we observed that mRNAs were still able to scan (Supplementary figure S5, S6 and S7 and movie S5, S6, S7). When we tracked 24PP7-*GLT1* mRNAs in the three different mutant cells, we found that mRNAs in  $\Delta sto1$  had similar diffusive behavior compared to mRNAs in WT cells (Figure 21A). However, in  $\Delta pml1$  and  $\Delta pml39$  cells, the diffusion behavior of mRNAs was quite different compared to WT cells and to  $\Delta mlp1/2$  cells (We saw 40% of mRNAs between 3 and 8 frames). Furthermore, we found no changes in the distance traveled by mRNAs when at the periphery from one frame to another (or within 37ms) in  $\Delta sto1$ ,  $\Delta pml1$ , or  $\Delta pml39$  cells, when comparing these to mRNAs from WT cells (Figure 21B). Finally, when we looked at the number of static frames in which the mRNA is at the periphery, we found no clear difference between mRNAs in  $\Delta sto1$ ,  $\Delta pml1$  and  $\Delta pml39$  cells compared to WT cells (Figure 21C). These results suggest that mRNAs do not scan for quality control purposes mediated by these proteins.



**Figure 21: mRNAs do not scan the periphery for quality control purposes involving  $\Delta sto1$ ,  $\Delta pml1$  and  $\Delta pml39$ .** (A) Frequency distribution of the number of frames mRNAs continuously in one focal plane. 183 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta sto1$  cells, 147 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml1$  cells, 132 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml39$  cells were tracked. (B) Frequency distribution of the distances mRNAs travel when scanning at the periphery in 37ms (from one frame of the movie to the other). 67 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta sto1$  cells, 104 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml1$  cells, 81 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml39$  cells were tracked. (C) Frequency distribution of the number of times mRNAs are static (move less than 100nm from one frame to the other) at the periphery before going out of the focus. 60 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta sto1$  cells, 90 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml1$  cells, 75 24xPP7 *GLT1* mRNAs from 20  $\Delta pml39$  cells were tracked.

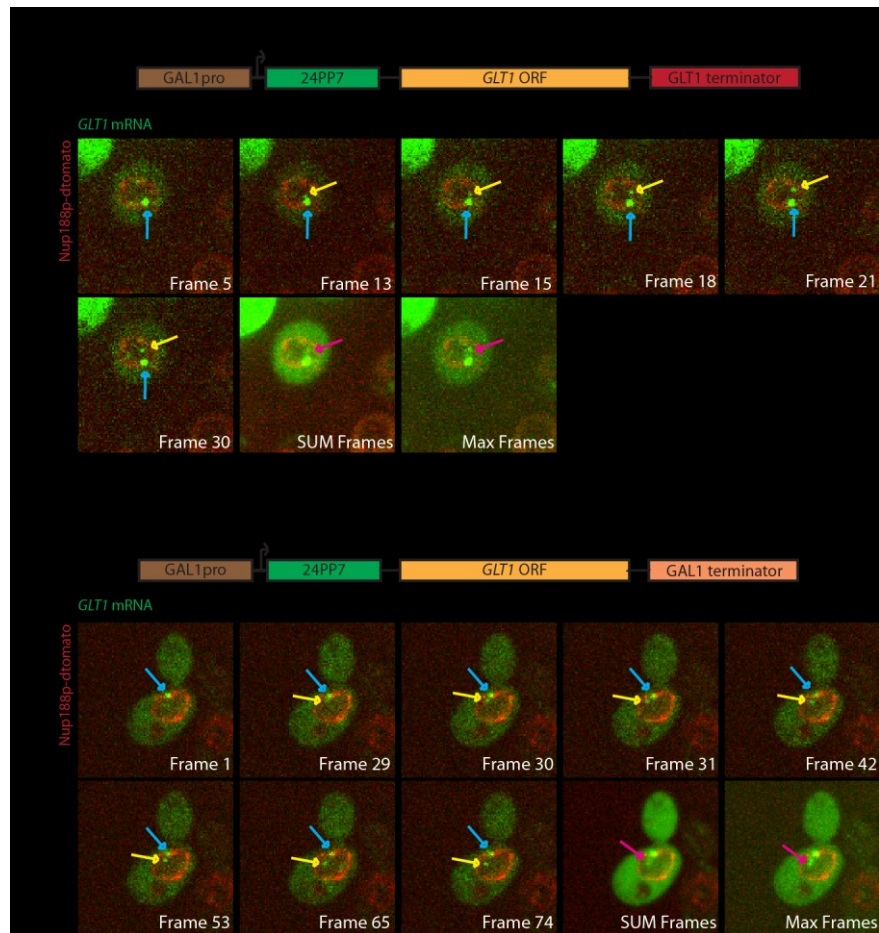
## Section II: Testing the gene gating hypothesis

As mentioned in the introduction, Gunter Blobel formulated the hypothesis that a nascent mRNA released from a gene attached to and transcribed at the nuclear periphery will directly be exported to the cytoplasm from the same pore<sup>158</sup>. It has been shown that for a gene to be attached to a nuclear pore, several components of the NPC must interact with its promoter (eg. Mlp1p, Nup1p). Furthermore, the *GAL* genes are known to be regulated by SAGA, which partially localizes to the periphery<sup>157</sup>. Given that SAGA, Mlp1p and Nup1p interact with the promoter region of the *GAL* genes<sup>150,157</sup>, a reporter gene, driven by the *GALI* promoter, should be tethered to the nuclear periphery. We therefore asked whether the gene-gating hypothesis applied to our 24PP7-*GLTI* reporter mRNA, expressed under control of the *GALI* promoter.

### 4.2.1 24PP7-*GLTI* mRNA is not directly exported to the cytoplasm

To determine if the 24PP7-*GLTI* mRNA is exported directly to the cytoplasm when the transcription site is at the periphery, we first looked at the 24PP7-*GLTI* mRNA behaviour in living WT cells after induction with galactose (Figure 22A). We reasoned that, if a transcription site is at the periphery and an mRNA is directly exported to the cytoplasm, we would see it released directly from the transcription site into the cytoplasm. If not, the mRNA would be first released into the nucleoplasm. As shown in Figure 22A, we observed that after induction of transcription of the GAL1p-24PP7-*GLTI* gene in WT cells, the transcription site was located at the periphery (shown by the blue arrow colocalizing with the Nup188p-

dtomato signal). Furthermore, we clearly observed an mRNA (yellow arrow) being released into the nucleoplasm, and not directly to the cytoplasm.



**Figure 22: 24xPP7-GLT1 mRNAs are released directly into the nucleoplasm even if the transcription site is at the periphery.** Images of different frames of a movie showing the behaviour of the transcription site (blue arrow) and single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrow) in WT cells (A figure: GAL1p-24PP7-GLT1-GLT1term. B figure: GAL1p-24PP7-GLT1-GAL1term) imaged at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope is stained in red by tagging Nup188p with dtomato and the PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 21 frames for movie shown in A and 74 for movie shown in B and MAX frames indicates maximum intensity projection of 21 frames for movie shown in A and 74 for movie shown in B.

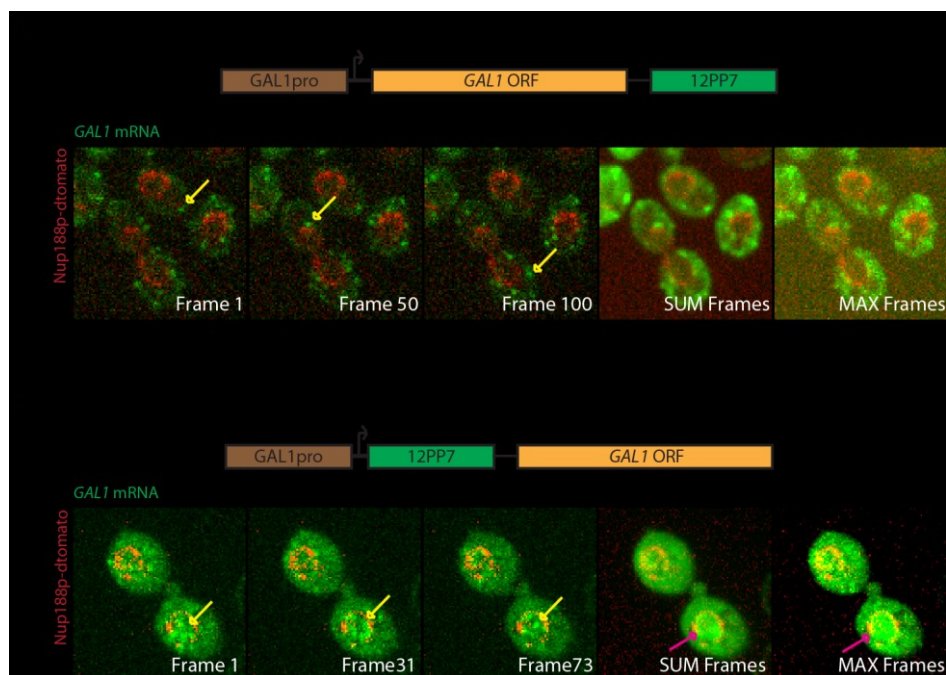
Given this observation, we asked whether the *GALI* promoter might be sufficient to tether genes at the nuclear periphery, but not sufficient to drive direct mRNA export. For instance, other regions in the *GAL* transcription unit might mediate direct export. The 3' UTR is an important regulatory unit for any mRNAs and we asked whether a bona fide *GALI* terminator might be necessary for export. Therefore, we exchanged the *GLTI* terminator in the 24PP7-*GLTI* mRNA with the *GALI* terminator. Importantly, we still observed mRNAs being directly released into the nucleoplasm. These results suggest that in the case of the 24PP7-*GLTI* gene, the mRNA does not get exported directly, even when the *GAL* locus is tethered to the periphery. Furthermore, the presence of the *GALI* promoter alone or the *GALI* promoter and the *GALI* terminator, has no effect on how the mRNA is exported.

#### **4.2.2 *GALI*-12PP7 might be directly exported to the cytoplasm**

If the reporter 24PP7-*GLTI* mRNA does not become exported directly to the cytoplasm when released from a transcription site located at the periphery, what happens to the endogenous *GALI* mRNA? Does it get exported directly? To address this issue, we tagged the *GALI* gene with 12xPP7 either in the 5' or in the 3' end, and we examined the behaviour of *GALI* mRNAs after induction with galactose. As mentioned before, one of the disadvantages of tagging a gene in the 3' end, is that it is difficult to see the transcription sites, because by the time the 12xPP7 or 24xPP7 tag sequence is transcribed and the loops form and become bound by the PP7-GFP proteins, the mRNA is most often already released from the transcription site. In Figure 23A, we looked at the behavior of the *GALI* mRNAs tagged with 12xPP7 in the 3' end. Interestingly, we could observe neither *GALI* transcription sites nor nuclear *GALI* mRNAs after galactose induction, although we quickly saw the appearance of

cytoplasmic *GAL1* mRNAs, indicating that transcription of the *GAL1*-12xPP7 gene occurred. We speculate that the *GAL1*-12xPP7 mRNAs were rapidly exported.

However, when we tagged the *GAL1* mRNA in the 5' end with 12xPP7 (Figure 23B), we saw an accumulation of *GAL1* mRNAs in the nucleus after induction. In this case, mRNAs were not exported and were not found in the cytoplasm. We cannot exclude the formal possibility that 5' tagging of the endogenous *GAL1* gene interferes with nuclear export. In conclusion, endogenous PP7-tagged *GAL1* mRNAs, unlike the *GAL*-24PP7-*GLT1* reporter, do not exhibit scanning and may be exported directly.

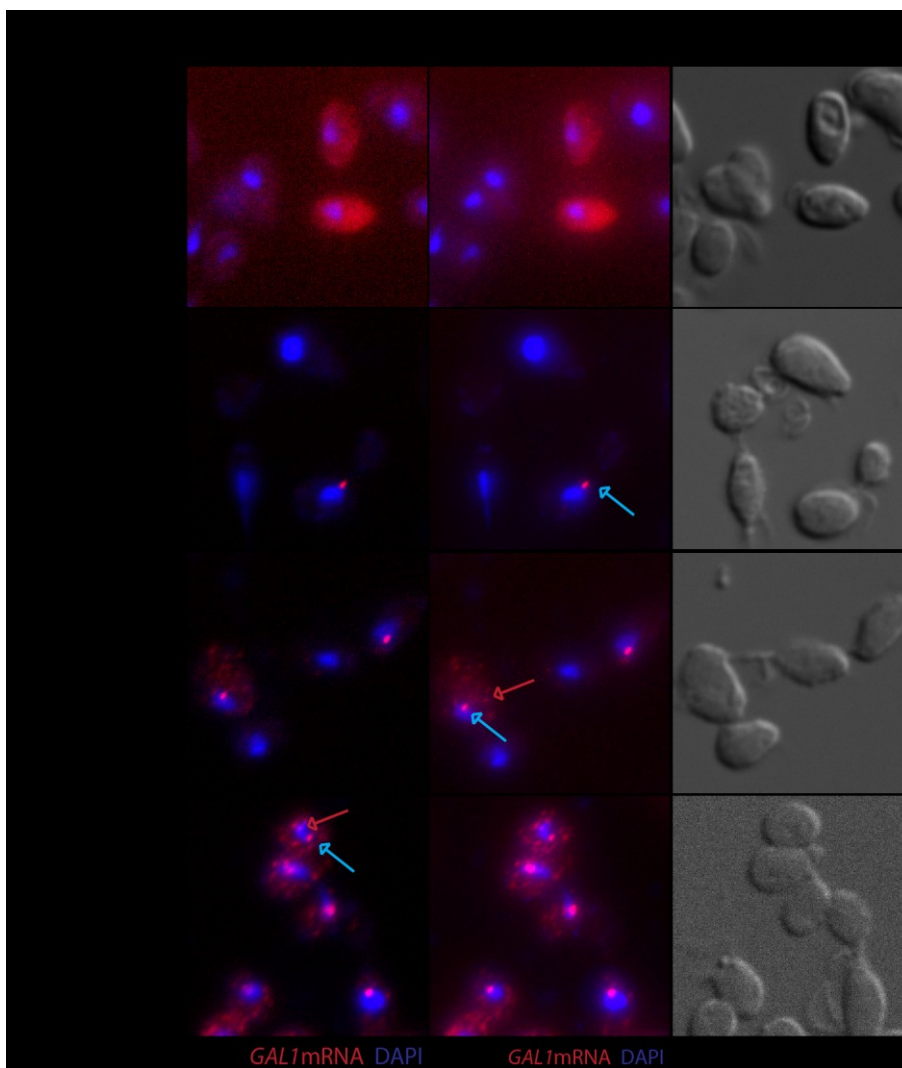


**Figure 23: *GAL1* mRNAs are not seen in the nucleoplasm except when they are tagged with 12xPP7 repeats in the 5'UTR.** Images of different frames showing the behaviour of single *GAL1*-12xPP7 mRNAs (figure A) and single 12xPP7-*GAL1* (figure B) mRNAs (yellow arrow) in WT cells imaged at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope is stained in red by tagging Nup188p with dtomato and the PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 100 frames for movie shown in A and 73 for movie shown in B and MAX frames indicates maximum intensity projection of 100 frames for movie shown in A and 73 for movie shown in B.



### 4.2.3 *GALI* mRNAs are rarely seen in the nucleoplasm

To determine if the PP7 repeats affect the behavior of the endogenous *GALI* mRNAs, we did FISH on WT cells, in which the *GALI* gene was not tagged with PP7 repeats and examined the pattern of nuclear *GALI* mRNA after induction with galactose (Figure 24). Prior to induction (at 0 min), we saw no *GALI* mRNA signals. After 5 minutes of induction, we found transcription sites in a few cells (blue arrow), but no nuclear *GALI* mRNAs. After 10 minutes of induction, we observed both transcription sites and cytoplasmic *GALI* mRNAs, but no nucleoplasmic mRNAs. After 15 minutes of induction, we saw only one cell with a transcription site at the periphery and two nuclear *GALI* mRNAs (red arrow) in the entire population examined. These results are in agreement with our previous observations in yeast tagged with 12xPP7 in the 3' end of the endogenous *GALI* gene. Furthermore, these results suggest that nuclear *GALI* mRNAs are rapidly, and perhaps directly, exported to the cytoplasm.



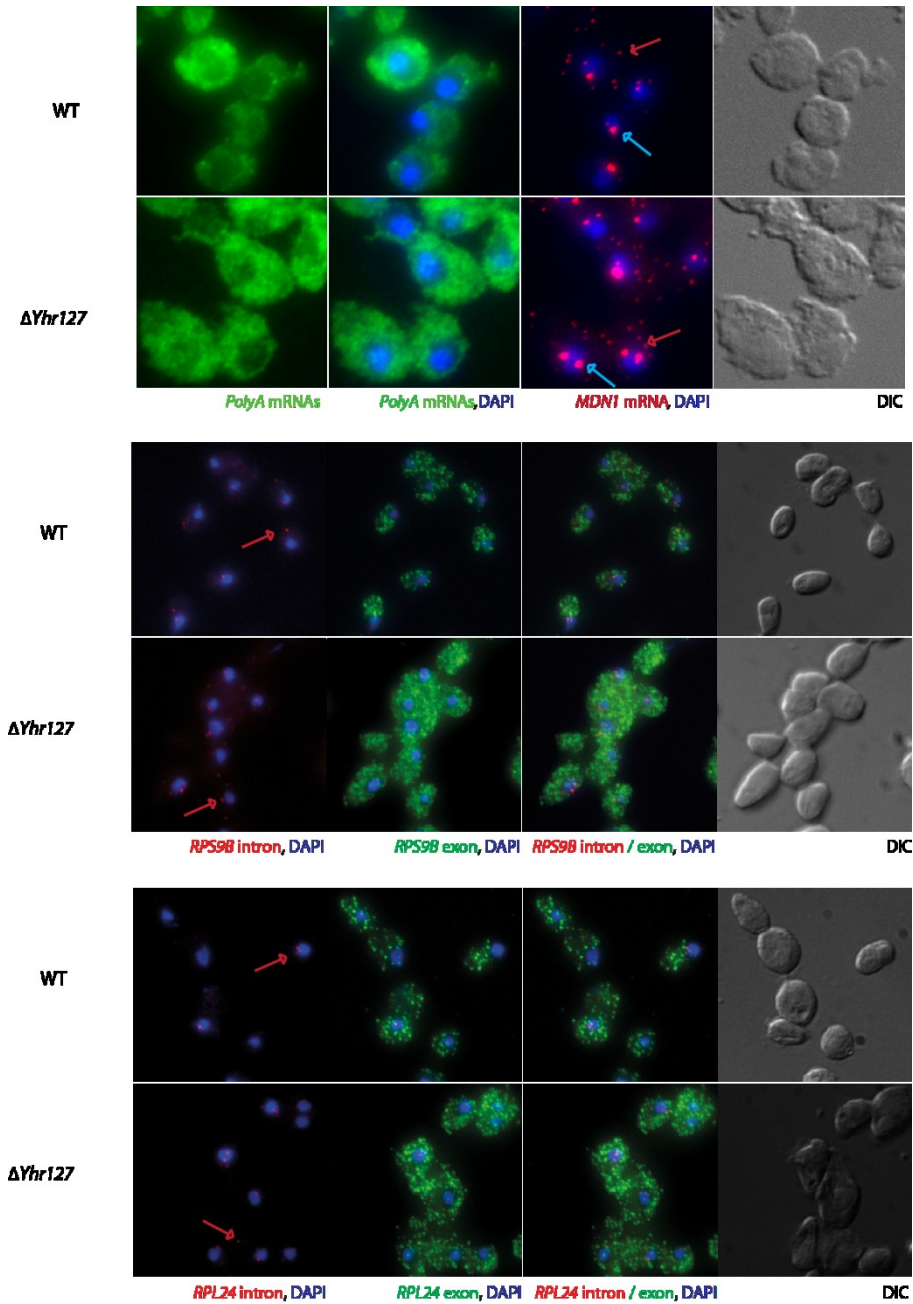
**Figure 24: *GAL1* mRNAs are rarely observed in the nucleoplasm.** *GAL1* mRNA FISH showing nuclear *GAL1* mRNAs. After 15 min induction, one single mRNA (red arrow) is observed in the nucleoplasm while the transcription site (blue arrow) is at the periphery. Cells were grown at 30°C in SD + 3% raffinose before inducing transcription of the *GAL1* gene with galactose before fixation and hybridized with DyLight594 (equivalent of cy3.5) labeled *GAL1* probes. *GAL1* mRNAs is shown in red and DNA is stained in blue (DAPI).

## **Section III: Characterization of the novel Yhr127 protein using microscopy**

In a separate collaborative project, joint with the Oeffinger laboratory at IRCM in Montreal, we functionally characterized a previously uncharacterized open reading frame, YHR127. Recent studies using protein pullout experiments, carried out by the Oeffinger laboratory, suggested that Yhr127p interacts with mRNAs co-transcriptionally, while still bound to RNA polII, and that it remains associated with those transcripts until they reach the nuclear periphery<sup>163</sup>. These data were supported by observations that this protein localizes to the nucleus and associates with the NPC, but not with cytoplasmic mRNPs<sup>29</sup>. Moreover, Yhr127p has an RNA-binding domain and is similar to the RNA export factor Yra1p. The function of Yhr127p, however, is still unclear. In this chapter we describe several experiments, in which we used microscopy to characterize the function of Yhr127 and to identify its role in mRNA biogenesis and export.

### **4.3.1 Deletion of YHR127 does not affect mRNA export but affects the mRNA levels of genes involved in ribosome biogenesis**

Since Yhr127p is thought to travel with the mRNA cargo to the NPC, we asked whether deletion of Yhr127p affects mRNA export or processing. First, we studied the role of Yhr127p in the export process using polyA FISH in WT and  $\Delta yhr127$  cells (Figure 25). Similar to WT cells,  $\Delta yhr127$  cells did not show polyA RNA accumulation in the nucleus, suggesting that this protein is not required for bulk mRNA export. To test whether specific mRNAs were affected in  $\Delta yhr127$  cells, we took a candidate approach.



**Figure 25: Deleting *YHR127* does not cause a polyA RNA accumulation in the nucleus, but an increase in the numbers of specific mRNAs.** FISH showing polyA RNA, *MDN1* mRNA, *RPS9B* and *RPL24* intron and exon in WT and  $\Delta yhr127$  cells. Cells were grown at 30°C in YPD before fixation and hybridized with cy3 labeled *MDN1*, *RPS9B* and *RPL24* intron probes, cy3.5 labeled *RPS9B* and *RPL24* exon probes and DyLight594 labeled oligo dT probes. *MDN1* mRNAs, *RPS9B* and *RPL24* intron are stained in red. PolyA RNAs, *RPS9B* and *RPL24* exons are stained in green and DNA is shown in blue (DAPI). Transcription sites are indicated with the blue arrow single mRNAs with the red arrow.

As shown in Figure 25, we performed smFISH for the *MDN1*, *RPL24* and *RPS9B* mRNAs in WT and  $\Delta yhr127$  cells. All three genes are implicated in ribosome biogenesis<sup>179</sup>.

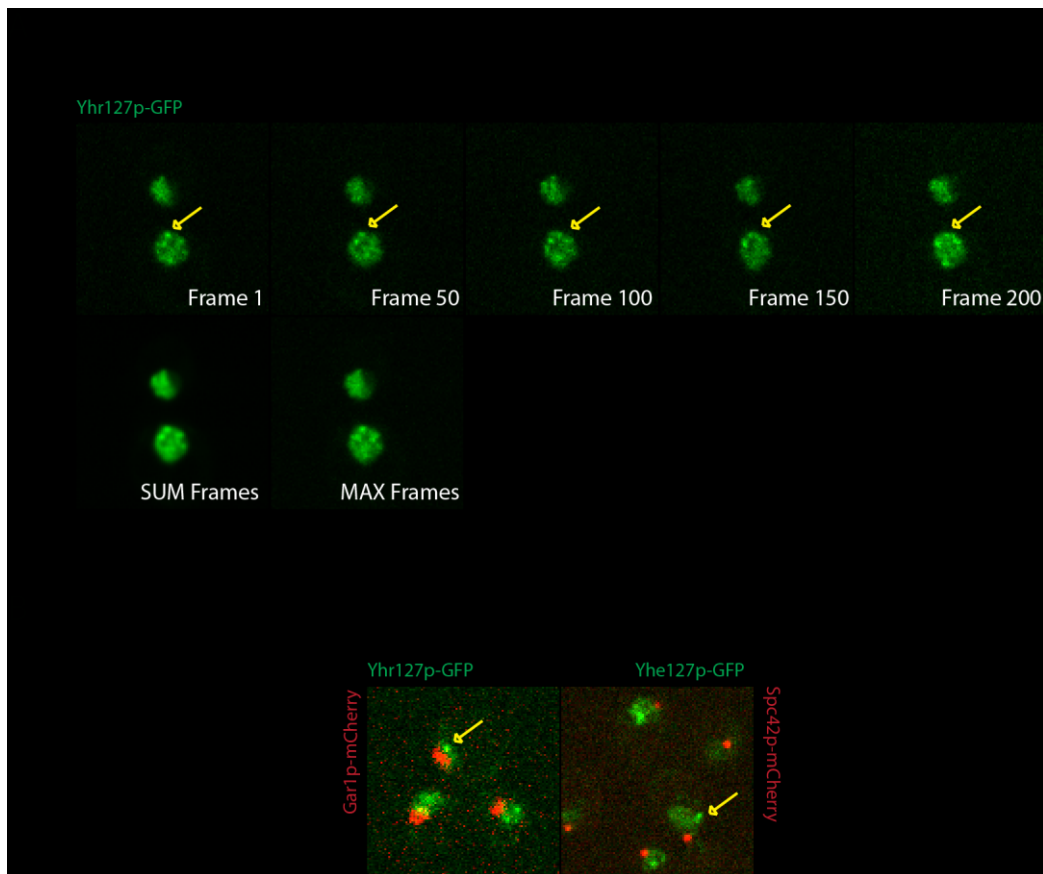
Interestingly, we observed brighter *MDN1* transcription sites (blue arrow) and an increase in the number of single *MDN1* mRNAs (red arrow) in  $\Delta yhr127$  compared to the WT. We also observed an increase in the number of *RPS9B* and *RPL24* mRNAs in  $\Delta yhr127$  cells compared to the WT. However, the RNA signals were not quantified because it was a preliminary experiment for a collaboration with Dr. Oeffinger's lab. These results suggest that, while Yhr127p does not affect nuclear mRNA export, it does regulate the mRNA levels of genes involved in ribosome biogenesis, potentially by modulating their transcription or stability of the mRNA or both.

### 4.3.2 Yhr127p is enriched in nuclear foci

To examine the subcellular localization of Yhr127p, we tagged it with GFP for high-speed live cell imaging analyses. Interestingly, we observed that Yhr127p was not only evenly distributed within the nucleoplasm (Figure 26A), but rather accumulated at one or more nuclear foci (yellow arrow). The SUM and MAX projection images show that the foci were relatively « static » compared to nuclear mRNAs. These results suggest that the Yhr127p has two forms: one form is freely diffusing in the nucleoplasm, and the other is present at foci of yet unknown function.

To better understand the nature of these foci we determined their localization relative to known nuclear markers, such as the nucleolus and the spindle pole body (SPB). We analyzed the localization of Yhr127p-GFP in cells in which either Gar1p or Spc42p were also

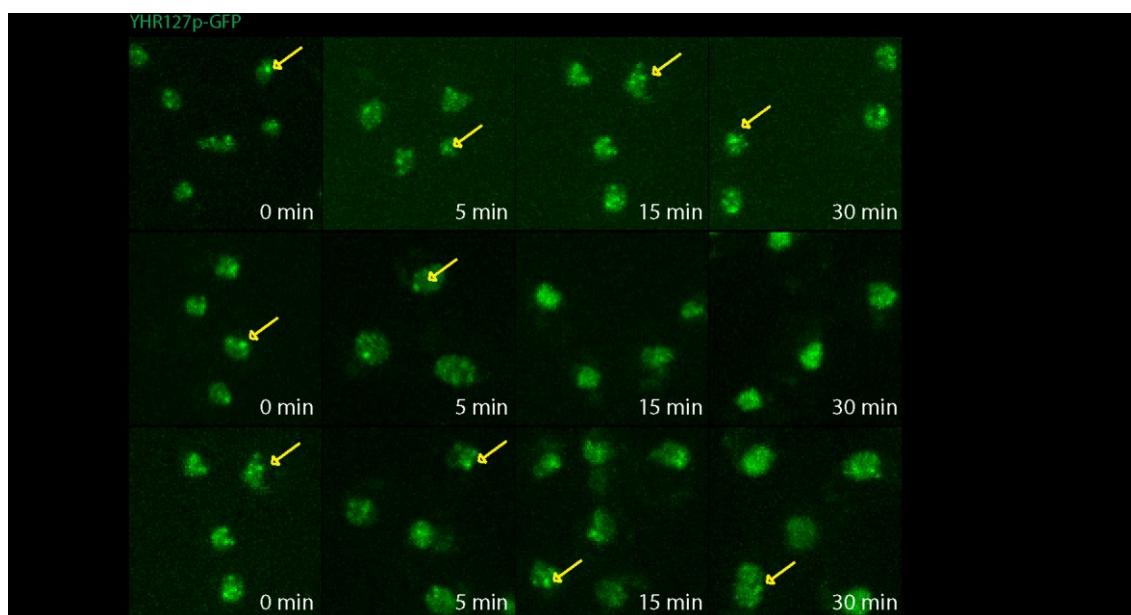
tagged with mCherry. Gar1p is a protein found in the nucleolus<sup>180</sup> and Spc42p is part of the SPB<sup>181</sup>. As shown in Figure 26B, Yhr127p foci did not colocalize neither with the nucleolus nor with the SPB. Further experiments are necessary to establish the identity of the Yhr127p containing foci.



**Figure 26: Yhr127p form foci in the nucleus, are excluded from the nucleolus and do not colocalize with the SPB.** (A) Images showing different frames of GFP tagged Yhr127p (yellow arrow) in WT cells, imaged at 33 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + glucose at 30°C. SUM frames indicate sum intensity projection of 200 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 200 frames. (B) Single z plane images showing the localization of GFP tagged Yhr127p and different nucleolar marker proteins in WT cells imaged at 33ms per z stack. Cells were grown in SD + glucose at 30°C. YHR127p is stained in green, the nucleolus and the SPB are stained in red by tagging Gar1p (nucleolus) and Spc42p (SPB) with mCherry.

### **4.3.3 The formation and maintenance of Yhr127p foci requires ongoing transcription**

Recent work from the Oeffinger and Robert laboratories showed using chromatin immunoprecipitation that Yhr127p is recruited co-transcriptionally to many genes. Therefore, we hypothesized that Yhr127 foci may represent the local accumulation of Yhr127p due to the presence of many active genes in a small region of the nucleus, possibly similar to transcription factories in higher eukaryotes. To test this, we investigated whether Yhr127p foci are sensitive to transcription inhibition. We determined number and distribution of Yhr127p foci both in heat shocked *rpb1-1* (a temperature sensitive mutant of RNA polymerase II) cells, and in WT cells treated with the transcriptional inhibitor 1,10 phenanthroline. As shown in Figure 27, 5 minutes after heat shock or after the addition of the inhibitor, Yhr127p foci were still present in the nuclei. However, after 15 minutes of heat shock, these foci were no longer visible and the Yhr127p-GFP signal was diffusely distributed within the nucleus. In contrast, Yhr127p foci were still visible after 15 and 30 minutes of 1,10 phenanthroline treatment, but they are less bright than in the control. These results suggest that the formation and maintenance of Yhr127p foci requires ongoing transcription.



**Figure 27: Yhr127p foci disappear after transcription arrest.** Images showing the distribution of GFP tagged Yhr127p in the nucleus after transcription arrest. Images were acquired at different time points after shifting the temperature sensitive *rpb1-1* cells from 25°C to 42°C, keeping at 25°C as a control, or after adding the transcription inhibitor 1,10 phenanthroline to WT cells. Z stacks were taken using 33 milliseconds exposures per stack, spanning the entire cellular volume. *rpb1-1* cells were grown in SD + glucose at 25°C and WT cells were grown in SD + glucose at 30°C. Images shown MAX projection of the Z stacks.



## Chapitre V :Discussion in English

Compartmentalization of RNA and protein synthesis between the nucleus and the cytoplasm, respectively, requires nucleocytoplasmic export of RNAs. This process is highly regulated by numerous factors, yet only some of the proteins that come into play (Mex67p, Yra1p, Nab2p and a few others) have been well characterized. Using single molecule techniques (live cell imaging using a variant of the MS2 system and fluorescence in situ hybridization) in *S. cerevisiae*, we were able to visualize and track individual mRNAs in single cells using fluorescence microscopy.

We showed that 24PP7-*GLT1* mRNAs are released into the nucleoplasm after induction of transcription of the 24PP7-*GLT1* reporter gene under control of the *GALI* promoter, even if the transcription site is located at the nuclear periphery (Figure 22). It is not clear if this is a general behaviour for all mRNAs transcribed at the periphery, as our results are not conclusive of whether the endogenous *GALI* mRNA is also released in the nucleoplasm or directly exported (Figure 23A). Our data might indicate a direct export, but we were not able to demonstrate this experimentally.

We then showed that single mRNAs scan the nuclear envelope (NE) when reaching the nuclear periphery (Figures 8B, 9A, 9B), and this occurs in an Mlp1p-dependent fashion. Other endogenous mRNAs, notably, *MDN1* and *CLB2*, which are released into the nucleoplasm, also exhibited a scanning behaviour similar to the reporter construct, suggesting that scanning is a general feature for mRNAs at the nuclear periphery.

We further studied the behaviour of single mRNAs in wild type and different mutant strains and showed that mRNAs behave differently when they are in the nucleoplasm versus at the nuclear periphery (Figure 15). Furthermore, our results show that the basket and the Mlp proteins can change the behavior of mRNAs, perhaps by affecting their diffusion; for instance, by changing simple diffusion (Brownian motion) in the nucleoplasm to a more directed movement at the nuclear periphery.

Why do mRNAs scan the nuclear envelope and what is the meaning of this process? We examined the behaviour of three different mRNAs released into the nucleoplasm from the transcription site and all exhibited scanning once they reached the nuclear periphery, suggesting the existence of a class of mRNAs that are not exported directly through the nearest nuclear pore they encounter. Previous work demonstrated that in mammalian cells,  $\beta$ -actin mRNAs scan the nuclear periphery prior to export<sup>91</sup>, indicating that scanning is conserved from yeast to higher eukaryotic organisms. Mammalian cells contain a single *MLP* homologue called Tpr<sup>105-108,111</sup> and it will be interesting if scanning in mammalian cells also requires the basket and/or TPR.

Because mRNAs scan in an Mlp1-dependent fashion and because deletion of the Mlps leads to an accumulation of RNAs in the nucleus (Figure 12B), we propose that scanning occurs to prepare mRNAs to be exported. In addition, the observation that mRNAs become less static at the nuclear periphery in the absence of *TOMI*, led us to speculate that mRNAs scan to facilitate the ubiquitination of Yra1p by Tom1p. Ubiquitination of Yra1p is known to lead to the release of Yra1p from the mRNA<sup>119</sup>, allowing the mRNA to go through the nuclear basket, into the channel of the NPC and transit to the cytoplasm.

Prior work has shown that Mlps have a role in quality control, for instance in retaining unspliced mRNAs in the nucleus<sup>114,122</sup>. Furthermore, a biochemical study showed that Nab2p, an RNA export factor that regulates the length of the polyA tail of an mRNA, interacts directly with the C-terminus of Mlp1p<sup>128,133</sup>. Recently, a new study showed that Rrp6p, a subunit of the nuclear exosome, plays a role in releasing Nab2p from mRNAs, which are subsequently degraded<sup>182</sup>. However, rapid mRNA export prevents Rrp6p from finding and releasing Nab2p from the mRNA and, consequently, degrading the mRNA. Taken together, these results suggest that Nab2p plays a role in mRNA quality control. Furthermore, given that Nab2p interacts with the C-terminus of Mlp1p, we propose that scanning plays also a role in mRNA quality control.

In addition, we showed that 24PP7-*GLT1* mRNAs, expressed under the control of the *GALI* promoter and harboring the 3'UTR of the *GALI* gene, are released into the nucleoplasm even if the 24PP7-*GLT1* reporter gene is found at the periphery (Figure 22B). This observation is not consistent with the gene gating hypothesis<sup>158</sup>. Interestingly, looking at the endogenous *GALI* mRNA suggests that this mRNA might be directly exported into the cytoplasm as we observe cytoplasmic but no nuclear mRNAs after inducing transcription of the *GALI* gene (Figure 23A). We do not understand why we see two different ways for the export of mRNAs that only have the ORF of the gene not in common. Alternatively, the insertion of the PP7 repeats in the 5' UTR might affect proper mRNP folding and direct export. Further experiments are required to fully understand this process.

Finally, we examined the role of Yhr127p in transcription and nuclear export. Yhr127p has been previously shown to interact with mRNAs during transcription and to

remain bound to them until they reach the nuclear face of the pore<sup>163</sup>. We found no RNA accumulation in the nucleus after deleting this protein (Figure 25A), suggesting that it has no effect on the export pathway. However, we observed an increase in transcription and cytoplasmic mRNA levels in *YHR127* deficient cells, which suggests that this protein might have a role in transcription. Furthermore, loss of YHR127p foci upon transcription arrest (Figure 26), raises the possibility that Yhr127p colocalizes with transcription factories<sup>183</sup>.

## Chapitre VI : Discussion en Français:

### 6.1 Bref aperçu des résultats

Tous les êtres vivants renferment dans leurs cellules le porteur de l'information génétique, qui est l'ADN. Cependant, cet ADN doit être transcrit en ARNm puis traduit en protéine pour permettre à la cellule de fonctionner. Chez les eucaryotes, l'ADN est enfermé dans le noyau, de même que l'ARNm. Ce dernier doit être exporté vers le cytoplasme pour être traduit.

Le processus d'export des ARNm n'est pas isolé des autres processus cellulaires (Figure 1 et 3). Durant la transcription, plusieurs facteurs et protéines responsables de l'export des ARN (Mex67p, Yra1p, Nab2p et autres) sont recrutées à ce dernier (Figure 3) pour former un ARN « mature », donc prêt à être exporté.

Notre premier objectif était de savoir comment l'ARNm est exporté. Plus précisément, comment va-t-il se comporter dans le noyau, et comment va-t-il trouver son chemin vers le cytoplasme (Figure 5). Nous avons trouvé que lorsque l'ARNm arrive à la périphérie du noyau, il commence à glisser sur l'enveloppe nucléaire. Nous avons nommé ce processus « scanning ». Également, nous avons voulu déterminer le rôle du panier nucléaire et des protéines responsables de l'export des ARN dans ce processus primordial pour la survie de la cellule. Nous avons trouvé que le panier nucléaire joue un rôle primordial dans le processus du « scanning », car sans cette structure, les ARNm ne peuvent plus « scanner ». De plus, nous nous sommes intéressés à une hypothèse émise par Blobel<sup>158</sup>, qui a suggéré que la transcription à la périphérie permet à l'ARNm naissant d'être directement exporté vers le

cytoplasme, via le même pore auquel est attaché le gène. Finalement, nous avons voulu identifier la fonction de Yhr127p, une protéine nucléaire, capable de se lier à l'ARNm depuis la transcription jusqu'au moment où l'ARNm arrive au niveau du NPC.

Étudier le processus d'export des ARNm vers le cytoplasme d'une manière directe était difficile dans le passé, car les techniques utilisées (western blots, two hybrid interaction, etc) nous permettaient pas de visualiser les ARNm en temps réel. Mais récemment, des techniques de molécules uniques comme le marquage des ARNm avec des protéines fluorescentes (systèmes MS2 et PP7), nous permettent d'être les premier à étudier ce processus en obtenant plus d'informations concernant le comportement des ARNm et les protéines impliquées lors de l'export de l'ARNm hors du noyau.

## **6.2 Les Mlps permettent aux ARNm de « scanner »**

En observant le comportement des ARNm dans des cellules sauvage, nous avons remarqué que suite à leurs relâchements du site de transcription, ils traversent le noyau en suivant un parcours aléatoire. Cependant, quand les ARNm arrivent à la périphérie nucléaire, ils « scannent » l'enveloppe nucléaire (Figures 8B, 9A, 9B).

De plus, en analysant le comportement des ARNm qui bougent dans le nucléoplasme et ceux qui « scannent » la périphérie du noyau, nous avons remarqué un comportement très différent (Figure 15). Premièrement, les ARNm sont moins retenus dans le nucléoplasme qu'à la périphérie et deuxièmement, ils se déplacent très rapidement dans le nucléoplasme, comparé aux ARNm se déplaçant à la périphérie (Figure 15B). Également, suite à la perte des protéines Mlp1p et Mlp2p (donc le panier nucléaire et l'inter-connection entre les pores), le

comportement des ARNm à la périphérie change et ressemble curieusement à celui des ARNm dans le nucléoplasme (Figure 15). Ces résultats suggèrent que l'ARNm « scanne » l'enveloppe nucléaire en s'accrochant directement ou indirectement sur les Mlps. De plus, ces résultats montrent que les Mlps influencent la diffusion et le mouvement de l'ARN lorsqu'il arrive à la périphérie (Figure 13).

Nous remarquons que lorsque nous délétions les protéines Mlp1p et Mlp2p, les ARNm sont plus mobiles et moins retenus à la périphérie (Figures 13 et 14). Le maintien des ARNm, directement ou indirectement par les Mlps, à la périphérie suggère la présence d'un processus/étape, ou même plusieurs étapes, qui prennent place au niveau des Mlps. Cependant, les résultats obtenus après l'analyse du comportement des ARNm dans des cellules  $\Delta mup133$  (301-1157) montrent que les Mlps à elles seules et particulièrement celles retrouvées entre deux NPC (Figure 4), ne peuvent pas maintenir les ARNm à la périphérie pour longtemps (Figures 17A et 17C). Donc la distribution aléatoire de pores nucléaires (et donc forcément des paniers nucléaires) sur l'enveloppe nucléaire, va permettre aux ARNm de passer plus de temps à la périphérie. En effet, chaque mouvement fait par un ARNm le mettra en contact avec les Mlps qui forment le panier et/ou l'inter-connection entre les pores.

### **6.3 Le « scanning », un processus répandu chez d'autres organismes eucaryotes?**

Après avoir étudié le comportement/mouvement des ARNm de 24PP7-*GLT1*, MDN1-12PP7 et CLB2-12PP7, nous avons trouvé que ces 3 ARNm « scannent » l'enveloppe nucléaire une fois à la périphérie du noyau. Mais est-ce que les ARNm d'autres organismes eucaryotes, « scannent » eux aussi lorsqu'ils atteignent la périphérie nucléaire? Curieusement,

le « scanning » a été observé pour l'ARNm  $\beta$ -actine chez des cellules de mammifères<sup>91,92</sup>. Cela signifie alors que ce phénomène n'est pas spécifique seulement à la levure *S. cerevisiae*. De plus, le fait que plusieurs ARNm différents « scannent », comme l'ARNm de *MDNI*, *CLB2* et *GLT1* chez la levure et  $\beta$ -actine chez les cellules mammifères, laisse penser que ce phénomène est peut-être répandu chez tous les eucaryotes. Chez les eucaryotes supérieurs, l'homologue des Mlps est Tpr. Cette dernière forme le panier nucléaire et ressemble énormément aux Mlps<sup>105-108,111 (14, 15, 16, 17, 33)</sup>. On peut donc proposer que le « scanning » des ARNm chez les cellules de mammifères se fait sur les protéines Tpr.

## 6.4 Les Mlps maintiennent les ARNm à la périphérie

Après avoir localisé et suivi les différents ARNm à la périphérie nucléaire, nous avons déterminé la distance parcourue chaque 37ms par chacun de ces ARNm. Après l'analyse des données de distance parcourue à la périphérie provenant d'ARNm de souche WT et  $\Delta mlp1/2$ , nous remarquons que la perte des protéines Mlp cause un changement dans le comportement des ARNm à la périphérie. Précisément, les ARNm se déplacent plus rapidement à la périphérie (Figure 14B). Nous remarquons aussi que moins d'ARNm (comparé à WT) bougent entre 50nm-100nm et entre 100nm-150nm.

Qu'est ce que ces distances représentent? Premièrement, le diamètre d'un pore est d'environ 100nm et la hauteur d'un panier nucléaire est de 95-100nm<sup>42-44</sup>. Également, Winey et al ont montré que la distance moyenne entre deux pores est d'environ 240nm<sup>177</sup>. Ils ont obtenu ce nombre en prenant le milieu du pore comme point de référence. Cependant, si nous prenons comme point de référence le côté du pore, cela veut dire que la distance entre 2 pores est environ 140nm. Également, si nous prenons le milieu du panier comme référence (le



milieu du panier est dans le même axe que le milieu du pore), la distance entre 2 paniers nucléaires sera environ 140nm aussi. Donc la distances entre 50nm et 100nm représente un pore unique et/ou un panier nucléaire unique, tandis que la distance entre 100nm et 150nm, représente la distance entre 2 pores et/ou la distance entre 2 paniers nucléaires.

Ainsi la diminution du nombre d'ARNm qui parcourent une distance à la périphérie entre 50nm et 100nm dans les cellules où *MLP1* et *MLP2* ont été délété (même constat lorsque *NUP60* et le C-terminale de *MLP1* sont délétés) par rapport aux ARNm à la périphérie dans les cellules WT (Figures 14B et 19B), pourrait signifier que la plupart des ARNm ne sont plus très bien maintenus au niveau de la périphérie et précisément au niveau du pore. Également, la diminution du nombre d'ARNm parcourant des distances entre 100nm et 150nm suite à la délétion des Mlps (même constat lorsque *NUP60* et le C-terminale de *MLP1* sont délétés aussi) par rapport aux nombres ARNm parcourant la distance entre 100nm et 150nm dans une souche WT, pourrait signifier qu'il y a perte de l'interaction entre les ARNm et les Mlps qui interconnectent les pores. Même raisonnement pour les résultats obtenus suite à la délétion de *NUP60* et de la région C-terminale de *MLP1* (Figure 19B).

Toutefois, nous savons qu'après avoir délété les Mlps, la totalité du panier nucléaire est perdu, mais est-ce le cas aussi lorsque *NUP60* ou la partie C-terminale de *MLP1* sont délétés? Cette question reste ouverte, mais avec la délétion de *NUP60*, nous perdons probablement la totalité du panier parce que le point d'ancrage de Mlp1p au niveau du pore est perdu. Cependant, la délétion de la région C-terminale de Mlp1p ne cause peut-être pas la perte totale du panier, mais d'une partie seulement.

En outre, lorsque nous avons analysé les distances parcourues par les ARNm à la périphérie, nous retrouvons environ 5% des ARNm qui ne bougent qu'entre 0nm et 50nm (donc la moitié du diamètre du pore ou la moitié de la longueur du panier nucléaire), même dans des cellules mutantes (Figures 11B, 14B, 17B). Est-ce que ce 5% est significatif? Nous avons délété ou mutés des gènes codant pour des protéines qui se trouvent dans le nucléoplasme (*TOM1* et *PML1*) ou des gènes codant pour des protéines qui se retrouvent du coté nucléoplasmique du pore (*NUP60*, *MLP1*, *MLP2* et *PML39*).

Comme le nombre d'ARNm se déplaçant entre 0nm et 50nm ne change pas dans tous ces mutants et que le milieu du pore (channel) et les filaments cytoplasmiques sont intacts, nous suggérons que ce 5% d'ARNm vient du fait que ce sont des ARNm qui se retrouvent dans le milieu du pore ou bien au niveau des filaments cytoplasmiques. De plus, quand nous comparons la distance parcourue à la périphérie par les ARNm 24PP7-*GLT1* filmés à un intervalle de 18.5ms à la distance parcourue par les ARNm 24PP7-*GLT1* filmés à un intervalle de 37ms (Supplementary figure 8), nous remarquons que le pourcentage d'ARNm se déplaçant entre 0nm et 50nm augmente pour les ARNm filmés à un intervalle de 18.5ms. Cela suggère que ce pourcentage est significatif et montre une phase réelle dans la vie d'un ARNm.

## 6.5 Quels rôles jouent Mlp2p durant le « scanning » ?

Suite à la délétion de *NUP60* et de la partie C-terminale de *MLP1*, Mlp2p est toujours accrochée aux pores<sup>110,115,116,134</sup>. Alors pourquoi les ARNm ne peuvent plus « scanner » lorsque Mlp2p est toujours présente au niveau de la périphérie nucléaire? En analysant nos résultats (Figures 18B et 19), nous pensons que Mlp2p ne peut prendre la relève de Mlp1p

parce que les ARNm ne peuvent plus « scanner » malgré sa présence. De plus, le graphique à la figure 19B montre que suite à la délétion de *NUP60* et la partie C-terminale de *MLP1* (donc Mlp2p est toujours présente au niveau du pore), les ARNm se comportent comme si *MLP1* et *MLP2* ont été délévés. On peut supposer que Mlp2p n'a pas les mêmes fonctions que Mlp1p (Mlp2p joue un rôle dans le fonctionnement normal du SPB)<sup>121</sup>, ou bien Mlp2p a besoin de Mlp1p pour former le panier nucléaire et la connection entre les pores et fonctionner normalement.

De plus, comme la surexpression de Mlp2p n'a aucun effet sur l'accumulation d'ARNm dans le noyau contrairement à la surexpression de Mlp1p<sup>109</sup> et que des études ont montré que Mlp2p joue un rôle dans l'organisation du noyau<sup>121,134</sup>, il est probable que Mlp2p ne joue aucun rôle dans le « scanning » des ARNm ou même l'export des ARNm.

## 6.6 Qu'elle est la signification du « scanning »?

Il semble que le comportement et la diffusion d'un ARNm dans le nucléoplasme change, lorsque ce dernier arrive à la périphérie (Figures 15). Pourquoi donc l'ARNm « scanne » sur l'enveloppe nucléaire? À quoi sert le « scanning »? Est-ce pour permettre l'export de l'ARNm ou pour permettre à une étape de contrôle de qualité au niveau de la périphérie de prendre place, avant que l'ARNm ne soit exporté? Il est difficile d'avoir une réponse claire. En délévant *MLP1* et *MLP2*, nous remarquons une accumulation d'ARN polyA dans le noyau (Figure 12B), ce qui concorde avec les résultats obtenus par Powrie et al<sup>164</sup>. Cette accumulation signifie que le processus d'export a été perturbé à cause de la perte des Mlps. Mais ce résultat ne permet pas de trancher pour l'une ou l'autre des hypothèses mentionnées ci-haut, proposant un rôle pour le « scanning ». Cependant, des études ont

montré que la surexpression de Mlp1p (et plus précisément la partie C-terminale de Mlp1p), cause l'accumulation d'ARNm dans le noyau<sup>109,128</sup>. Cela peut suggérer que Mlp1p, suite à sa surexpression, retient des facteurs d'export des ARN et ne permet pas leur association avec des ARNm pour que ces derniers soient exportés. Ces résultats suggèrent que Mlp1p joue un rôle direct dans l'export des ARNm.

Les résultats obtenus après avoir délété *TOM1* pourraient nous donner un indice. Suite à la délétion de *TOM1*, les ARNm « scannent » (Supplementary figure 4) lorsqu'ils se retrouvent à la périphérie de façon similaire aux ARNm de cellules sauvages (Figure 20B). Après avoir analysé le nombre de fois que les ARNm deviennent statiques en « scannant » la périphérie nucléaire, nous avons remarqué qu'ils (dans une souche  $\Delta tom1$ ) se comportent comme dans une souche  $\Delta mlp1p/mlp2p$  (Figure 20C). Curieusement, les ARNm d'une souche  $\Delta tom1$  traversent la même distance (à la périphérie) durant 37ms que les ARNm d'une souche WT (Figure 20B). Ces résultats suggèrent que les ARNm sont quand même maintenus à la périphérie, mais le fait qu'ils s'arrêtent moins en « scannant » la périphérie nucléaire (exactement comme dans une souche où *MLP1* et *MLP2* ont été délétés) montre qu'il y a un processus à la périphérie nucléaire impliquant Tom1p. Comme Tom1p ubiquitine Yra1p au niveau de la périphérie nucléaire<sup>119</sup> pour permettre son relâchement de l'ARNm, nous pensons que un des rôles du « scanning » est de permettre à Tom1p et Yra1p de se rencontrer, pour permettre le relâchement de Yra1p de l'ARNm.

De plus, une étude menée par Stutz montre que Yra1p-Mex67p-Nab2p forment un complexe trimérique lorsqu'ils se retrouvent sur l'ARNm<sup>119</sup>. Ainsi, nous suggérons que, lorsque Tom1p ubiquitine Yra1p et que se dernier se sépare de l'ARNm, cela induira la

réorganisation de l'ARNm et du complexe Yra1p-Mex67p-Nab2p à cause de la perte de Yra1p au niveau de la périphérie nucléaire.

Toutefois, il est possible que l'ARNm continue à « scanner » même si Yra1p ne se retrouve plus sur l'ARNm. Donc il va « scanner » pour trouver un pore libre par lequel il pourra sortir vers le cytoplasme. Cependant, l'ARNm « scanne » sur une distance qui est plus grande que le diamètre du pore, ce qui implique que l'ARNm entre en contact avec plusieurs pores pendant son « scanning ». Cela suggère que chaque contact entre l'ARNm et le pore ne provoque pas nécessairement l'export de ce dernier, Est-ce parce que l'étape nécessaire qui permet à l'ARNm de passer le panier nucléaire et se retrouver au milieu du pore ne se fait pas, ou parce qu'il existe des pores spécialisés qui permettent seulement l'export d'ARNm, tandis que d'autres pores permettent l'importation des protéines? Grunwald et al ont suggéré l'existence de pores spécialisés<sup>92</sup> mais jusqu'à maintenant aucune étude n'a été faite en ce sens.

## **6.7 Qu'elles protéines liant l'ARN aident les ARNm à « scanner »?**

Nous avons montré que les Mlps sont nécessaires pour permettre que le processus de « scanning » fonctionne bien. Nous connaissons les protéines au niveau de la périphérie requises pour le « scanning », mais qu'en est-il des protéines sur l'ARNm? Une étude a montré avec l'aide de la technique double hybride que la partie C-terminale de Mlp1p et la protéine Nab2p interagissent directement. Quand nous avons délété la partie C-terminale de Mlp1p induisant un défaut dans le « scanning » (Figure 18B), nous avons pensé que la perte de l'interaction entre Nab2p et le C-terminale de Mlp1p, en mutant l'acide aminé phénylalanine 73 en acide aspartique, ne permettra plus aux ARNm de « scanner ».

Étonnamment, les ARNm pouvaient toujours « scanner » (Supplementary figure 3), mais la distance parcourue pendant 37ms lorsqu'ils se trouvaient à la périphérie était semblable à la distance parcourue par les ARNm à la périphérie lorsque les Mlps étaient déléetées (Figure 19B).

Le fait que les ARNm puissent toujours « scanner » même si la liaison entre Nab2p et Mlp1p est perdue, suggère qu'une autre protéine (Mex67p, Yra1p ou Npl3p) interagit avec la partie C-terminale de Mlp1p, permettant le « scanning ». De plus, une étude a montrée que la surexpression de la partie C-terminale de Mlp1p cause l'accumulation de d'ARNm dans le noyau<sup>128</sup>. Curieusement, la surexpression des résidus de la partie du C-terminale qui interagissent avec Nab2p (résidus 1586 à 1779 de Mlp1p), cause une accumulation moindre d'ARN<sup>133</sup>. Ces résultats signifient aussi que d'autres protéines (autres que Nab2p) permettant l'export des ARNm interagissent avec la partie C-terminale de Mlp1p.

Également, nos résultats suggèrent que l'interaction entre le C-terminal de Mlp1p et Nab2p n'est pas le premier point de contact entre l'ARNm et les Mlps (Panier nucléaire) et que Nab2p n'a aucun effet sur la capacité de l'ARNm à « scanner » parce que l'ARNm reste attaché à la périphérie et « scanne » même si l'interaction entre Nab2p et Mlp1p est perdue. Cependant, nous pensons que l'interaction entre Nab2p et Mlp1p est une interaction qui arrive assez fréquemment pour permettre à l'ARNm de se déplacer moins rapidement à la périphérie dans une souche WT durant 37ms par rapport aux ARNm d'une souche *nab2F73D* (Figure 19B).

## 6.8 L'interaction entre Nab2p et Mlp1p peut être indirectement liée au processus d'export

Comme mentionné ci-haut, Nab2p et la partie C-terminale de Mlp1p interagissent directement, mais qu'elle est la signification de cette liaison? Il a été démontré que Nab2p contrôle la longueur de la queue polyA, interagit avec Mex67p et Yra1p (ces 3 protéines forment un complexe trimérique) et est un facteur d'export des ARNm<sup>82,83</sup>. Comme le changement de l'acide aminé F 73 en D cause seulement l'accumulation d'ARNm dans le noyau chez 8.2% des cellules<sup>133</sup>, nous suggérons que cette interaction, même si elle arrive fréquemment, n'a aucun effet majeur sur la capacité de la cellule d'exporter des ARNm. Également, les cellules *nab2F73D* poussent normalement à 30°C, ce qui signifie que cette interaction n'est pas primordiale et essentielle à la survie de la cellule et à la survie du processus d'export des ARNm.

Le panier nucléaire, formé de Mlp1p et Mlp2p, joue le rôle de portier qui permet le passage des ARNm du noyau vers le cytoplasme et Nab2p joue un rôle dans le contrôle de la longueur de la queue polyA et dans l'export des ARNm. Alors si l'interaction entre la partie C-terminale de Mlp1p et Nab2p est cruciale au déroulement normal du processus d'export, plus que 8.2% des cellules *nab2F73D* devraient accumuler des ARNm dans leurs noyaux et causera donc un arrêt de croissance de la cellule. Par conséquent, nous pensons que l'interaction entre Nab2p et Mlp1p joue un rôle mineur dans le processus d'export ou bien joue un autre rôle (peut-être rôle de contrôle de qualité), mais lié d'une façon ou d'une autre à l'export. Cette hypothèse pourrait être valide si aucune autre protéine ne peut jouer le rôle de Nab2p (dans des cellules *nab2F73D*).

Les protéines connues qui jouent un rôle dans l'export des ARNm sont Yra1p, Mex67p, Nab2p et Npl3p. Yra1p n'est pas un bon candidat car elle est relâchée de l'ARNm au niveau du pore nucléaire<sup>119</sup> donc ce n'est pas elle qui permet à l'ARNm de passer à travers le panier nucléaire. Comme les ARNm peuvent toujours être exportés dans une souche où l'interaction entre Nab2p et Mlp1p est perdue, il est fort probable que la protéine qui permet le passage de l'ARNm au cytoplasme soit Mex67p ou bien Npl3p. Malheureusement, aucune étude n'a pu montrer que si Mex67p ou Npl3p interagissent directement avec Mlp1p ou Mlp2p.

## **6.9 Nab2p pourrait jouer un rôle de contrôle de qualité**

Si l'interaction entre Nab2p et la partie C-terminale de Mlp1p ne joue aucun rôle dans l'export, peut-être que cette interaction est importante pour permettre de contrôler la qualité des ARNm, et plus précisément contrôler la longueur de la queue polyA. Cette hypothèse reste critiquable en effet, une étude a montré un lien entre Nab2p et Rrp6p<sup>182</sup>. Rrp6p fait partie de l'exosome nucléaire et se retrouve strictement dans le noyau<sup>184</sup>. Cette étude a montrée que Nab2p sera relâchée de l'ARNm suite à une interaction directe entre elle et Rrp6p. Par la suite, l'ARNm sera dégradé par Rrp6p.

Toutefois, ce groupe suggère que si l'ARNm est exporté rapidement, Rrp6p n'aura pas le temps de trouver Nab2p, de le relâcher de l'ARNm et de dégrader ce dernier. Cette étude suggère un rôle indirect de Nab2p dans la dégradation des ARNm. Ce rôle peut être vu comme un rôle de contrôle de qualité car l'ARNm qui restera longtemps dans le noyau (à cause d'un défaut quelconque), sera finalement dégradé par Rrp6p après le relâchement de Nab2p de l'ARNm.



## 6.10 Les ARNm scannent-ils sur les Mlps pour être contrôlés?

Plusieurs études ont montré un rôle des Mlps dans le maintien des ARNm avec introns non-épissés dans le noyau. De plus, une étude a montré que Pml39p (qui joue un rôle dans le maintien des ARNm non épissés dans le noyau également) se trouve attaché à Mlp1p<sup>122</sup>. Ces observations laissent penser que le panier nucléaire (les Mlps) induit ou favorise des étapes de contrôle de qualité. Cependant, quand Pml39p ou Pml1p sont délétées, nous ne remarquons aucun changement significatif dans le comportement des ARNm à la périphérie. Plus précisément, les distances parcourues durant 37ms par les ARNm lorsqu'ils se trouvent à la périphérie dans des souches  $\Delta pml1$  et  $\Delta pml39$ , ressemblent aux distances parcourues par les ARNm dans une souche WT (Figure 21B). Cela suggère que ces protéines n'ont aucun effet direct ou indirect sur le « scanning » des 3 ARNm étudiés, peut-être par ce qu'ils ne contiennent pas d'introns (les ARNm de *CLB2*, *MDN1* et *GLT1* ne contiennent pas d'introns).

Mais qu'elle est la définition d'une étape de contrôle de qualité? Jusqu'à maintenant, la plupart des études qui ont examiné les étapes de contrôle de qualité des ARNm, ont choisie d'étudier des ARNm avec des introns non-épissables. Mais est ce qu'il y a d'autres critères importants contrôlés par la cellule avant l'export? Premièrement, la perte d'une protéine (autre que les facteurs d'export des ARN) qui se lie à l'ARNm et qui est essentielle à un processus ou à une étape avant ou pendant l'export. Deuxièmement, la perte d'une protéine qui peut marquer l'ARNm ou une protéine sur l'ARNm, et garantit que ce dernier est « mature » et prêt à être exporté. Troisièmement, un mauvais repliement de l'ARNm causer par la perte

d'une ou de plusieurs protéines qui l'aident à se replier et à devenir « mature ». Quatrièmement, la perte du contrôle de la queue polyA ou de la partie 3' de l'ARNm.

Il est impossible pour nous de vérifier que la perte d'une protéine qui marque l'ARNm ou la perte d'une protéine qui permet le repliement de l'ARNm cause la perturbation ou la perte du « scanning », car jusqu'à maintenant nous ne connaissons aucune protéine qui peut jouer ce rôle. Cependant, nous avons essayé de savoir si le « scanning » est affecté par la perte de Sto1p, une composante de la coiffe, et nous ne remarquons aucun changement dans le « scanning » et le comportement général des ARNm (Figure 21). De plus, la seule protéine connue jusqu'à maintenant qui se lie et contrôle la longueur de la queue polyA, curieusement interagit avec Mlp1p (C-terminale de Mlp1p plus précisément). Cette protéine est Nab2p.

### **6.11 La présence du panier nucléaire peut être régulée**

Nous avons montré que les Mlps étaient des protéines importantes pour le « scanning » et l'export (Figures 12A et B). Étonnamment, une étude a montré que suite à un choc thermique, Mlp1p se détache de la périphérie et se retrouve concentrée dans un foci<sup>112</sup>. Nab2p et Yra1p sont également retrouvées dans ce foci. Nab2p interagit avec la partie C-terminale de Mlp1p, probablement pour cette raison qu'elle se retrouve dans ce foci avec Mlp1p. De plus, la présence de Yra1p dans ce foci signifie que cette dernière pourrait interagir directement avec Mlp1p.

Toutefois, le fait que Mlp1p se détache du reste du NPC (donc on perd le panier nucléaire) suite à un choc thermique est étonnant. Quel est l'intérêt pour la cellule de perdre le panier nucléaire lors de ce stress? Lorsque la cellule subit un choc thermique, elle arrête toute

transcription des gènes non essentiels, se concentre sur la transcription des gènes de choc thermique (heat shock genes) et sur l'export de ces ARNm. La perte du panier, pourrai alors permettre un export plus rapide des ARNm des gènes de choc thermique sans pertes de temps lié à l'encombrement dues aux processus qui se font au niveau du panier nucléaire. Mais les ARNm sont-ils exportés plus rapidement vers le cytoplasme si le panier nucléaire n'est pas présent? Cette hypothèse reste critiquable car la perte du panier nucléaire (perte de Mlp1p et Mlp2p) cause l'accumulation d'ARNm en temps normal (Figure 12B).

Nous ne retrouvons pas de Mlps dans le nucléole des cellules de levure *S. cerevisiae*, pourquoi<sup>104,114</sup>? Si le panier nucléaire joue un rôle dans le contrôle de qualité des ARNm, il est difficile de penser que les ARNr ne sont pas contrôlés. Mais on peut envisager que le panier est présent pour contrôler seulement les ARNm et non les autres types d'ARN. Également, les ARNr pourraient être contrôlés selon un autre processus. Cependant, le fait qu'on ne trouve pas de panier nucléaire pour les pores se trouvant dans le nucléole peut-être attribué au fait que les ARNr doivent sortir rapidement vers le cytoplasme pour former les ribosomes et que la présence d'un panier nucléaire peut les ralentir.

## **6.12 La voie choisie pour sortir du noyau diffère d'un ARNm à l'autre**

En observant les vidéos de 24PP7-*GLT1* (Figure 8B, movie1, movie4, movie6), nous remarquons que les sites de transcription sont toujours à la périphérie. Cette observation est en concordance avec d'autres études qui ont trouvé que le site de transcription des gènes *GAL* (*GAL1*, *GAL7* et *GAL10*) se trouve la plupart du temps à la périphérie<sup>150,157</sup>. Avoir un gène sous le contrôle d'un promoteur des gènes *GAL* est suffisant pour permettre à un gène d'être attaché à la périphérie nucléaire. En effet, plusieurs études ont montré que Mlp1p, SAGA,

Nup2p interagissent avec le promoteur du gène *GALI*<sup>150,157</sup>. Toutefois, dans des cellules où les Mlps ont été délété, les sites de transcription sont quand même à la périphérie (Figure 12C), ce qui veut dire que le panier nucléaire n'est pas nécessaire à l'attachement des gènes à la périphérie.

Néanmoins, pourquoi ne retrouve t-on pas 100% des sites de transcription de *GALI* (ou qui sont sous le contrôle du promoteur du gène *GALI*) à la périphérie lorsqu'ils sont actifs dans des cellules sauvage? Est-ce que le locus en question par son mouvement aléatoire dans le noyau (Voir introduction) heurte un panier nucléaire par hasard et reste attaché là-bas pour un moment avant d'être relâché?

Une partie de la réponse vient lorsqu'on regarde la position du site de transcription de 24PP7-*GLT1* (qui est sous le contrôle du promoteur *GALI*) dans la souche  $\Delta$  *nup133* (301-1157) (Figure 16B). Les pores nucléaires dans cette souche ne sont pas également distribués sur l'enveloppe nucléaire, mais sont concentrés à une ou deux places sur l'enveloppe nucléaire (Figure 16A). Donc si le gène 24PP7-*GLT1* sous le promoteur *GALI* se trouve loin de ces pores, la transcription de ce gène se fera vraisemblablement dans le milieu du noyau, comme dans la figure 16B.

Cependant, si le gène est proche de ces pores, il y a de fortes chances que par ces mouvements aléatoires, il heurtera un pore et restera attaché à lui. Ainsi dans une souche sauvage, où tous les pores sont bien dispersés sur l'enveloppe nucléaire, les sites de transcription des gènes *GAL* se retrouvent la plupart du temps (71%) à la périphérie. De plus, la possibilité que ce soit par hasard que le gène se retrouve à la périphérie peut expliquer pourquoi pas 100% des gènes *GAL* se retrouvent à la périphérie lorsque actif (Si un gène se

retrouve dans le milieu du noyau, il ne pourra pas heurter par hasard un pore car il se trouve loin de là).

### **6.13 L'attachement d'un gène à la périphérie et l'effet sur la transcription :**

Toutefois, est-ce que l'attachement d'un gène à la périphérie a un effet sur sa transcription ? Est-ce que l'attachement à la périphérie est un pré-requis à l'induction de la transcription ou l'attachement d'un gène à la périphérie est une conséquence de la transcription? Une nouvelle étude sortie en 2013 par un groupe menée par Stutz<sup>185</sup>, montre que le gène *GALI* se déplace vers la périphérie, où se trouve Ulp1p (elle est attachée aux Mlps), pour permettre l'activation de la transcription du gène *GALI*. Cette étude montre le rôle de la périphérie dans l'activation de la transcription des gènes *GAL* et donne un argument à la communauté scientifique qui pense que ce phénomène n'est pas isolé et que la présence d'un gène à la périphérie facilite la transcription.

Mais pourquoi donc le gène reste toujours attaché à la périphérie si la transcription de ce dernier est déjà active? Nous pouvons imaginer plusieurs explications plausibles. Premièrement, il est possible que le gène reste attaché à un pore pour permettre la ré-initiation de la transcription de façon plus rapide et efficace. Deuxièmement, il est possible que les facteurs nécessaires à la transcription des gènes, se retrouvent concentrés la périphérie nucléaire. Troisièmement, il est possible que la transcription du gène se fasse à la périphérie pour permettre l'export direct de l'ARNm qui sera relâché de ce site de transcription.

Cette hypothèse a été suggérée en premier par Blobel<sup>158</sup>. Toutefois, lorsque le gène *GLTI* est sous le contrôle du promoteur *GALI*, les ARNm sont toujours relâchés dans le nucléoplasme (Figure 22A). Même constat si on échange le 3'UTR de *GLTI* par le 3'UTR de *GALI* (avec la présence du promoteur du gène *GALI*) (Figure 22B). Curieusement, quand nous marquons les ARNm de *GALI* (gène endogène) avec 12xPP7 en 3'UTR, il est très difficile de trouver un ARNm dans le noyau suite à l'induction de la transcription de ce gène (Figures 23A et 24), tandis que nous retrouvons beaucoup d'ARNm dans le cytoplasme. Cela suggère que l'ARNm de *GALI* est directement exporté vers le cytoplasme.

Alors pourquoi les ARNm de *GALI* sont directement exportés du noyau, tandis que ceux de 24PP7-*GLTI* ne le sont pas (même si la seule différence entre eux est la séquence du gène)? Il y a plusieurs possibilités : La séquence de l'ADN, l'effet des gènes avoisinant, ou même l'ARNm peut être marqué d'une manière qui va donner un signal à la cellule indiquant que ce dernier doit être exporté directement.

Il est difficile de dire laquelle des ces possibilités peut avoir un effet sur l'export des ARNm. Toutefois, le fait que les ARNm de *GALI* marqués par 12xPP7 en 5'UTR montrent une accumulation dans le noyau, peut suggérer un rôle du 5'UTR du gène *GALI* dans l'export direct des ARNm. Il est connu que *GALI* et *GALI0* partagent le même promoteur<sup>186</sup>. De plus, un ARNnc est formé suite à la transcription qui débute à la partie 3'UTR de *GALI0* et fini au début du ORF de *GALI*<sup>186</sup>. Cependant, le rôle de cet ARNnc est de maintenir l'arrêt de la transcription en présence de glucose et n'a aucun rôle sur l'export des ARNm de *GALI* ou *GALI0*<sup>186</sup>. Connaissant tout cela, nous pensons qu'il y a une ou plusieurs protéines importantes et nécessaires à l'export direct des ARNm de *GALI* qui se lient à leurs 5'UTR et

qui en présence des 12xPP7 (en 5'UTR), cette interaction ne prend plus place, ce qui cause une accumulation d'ARNm dans le noyau à la place de l'export direct.

## 6.14 YHR127p joue un rôle durant la transcription

Suite à ce qui est connu concernant les étapes par lesquelles traversent chaque ARNm (Figure 1) et aux résultats obtenus concernant Yhr127p, nous pouvons conclure que cette protéine joue un rôle dans la transcription ou elle a un effet sur la stabilité des ARNm. Cependant, déléter cette protéine et ne pas provoquer de phénotype évident montre que cette protéine n'est pas essentielle à la survie de la cellule. De plus, l'absence d'accumulation d'ARNm dans le noyau (Figure 25) lorsque cette protéine est déléetée montre qu'elle n'a aucun effet majeur sur le processus d'export des ARNm.

Toutefois, suite à la délétion de *YHR127*, nous remarquons une augmentation du nombre d'ARNm de *MDN1* et l'augmentation du niveau de transcription du gène *MDN1* (Figure 25). De plus, nous remarquons une augmentation du nombre d'exons et d'introns de *RPS9B* et *RPL24* dans des cellules  $\Delta yhr127$ . Ces résultats montrent que la perte de Yhr127p cause une déstabilisation au niveau de la transcription, ou une déstabilisation au niveau de la cellule qui requiert la production de plus d'ARNm. Curieusement, les ARNm testés (*MDN1*, *RPS9B* et *RPL24*) sont reliés étroitement à la production de ribosome<sup>175,179</sup>. Dans le futur, il serait donc intéressant de tester si cette augmentation du niveau de transcription et de la production d'ARNm est aussi observée pour des ARNm qui n'ont aucun rôle direct dans la croissance cellulaire. De plus, le fait d'avoir plus d'introns dans le noyau et même dans le cytoplasme, peut suggérer que cette protéine joue un rôle dans le contrôle de qualité des

ARNm. Cependant, l'augmentation du nombre d'introns dans la cellule est peut-être due à l'augmentation de la transcription.

De plus, nous avons remarqué que YHR127p se trouve sous 2 formes : concentrée dans un foci ou bien libre dans le nucléoplasme (figure 26A). Qu'est ce que signifie la formation de foci? Nous ne sommes pas certain jusqu'à maintenant de la signification de l'existence de ces foci. L'accumulation de protéines dans une ou plusieurs place dans le nucléoplasme suggère la présence d'un processus qui requiert la présence de Yhr127p en grande quantité. Cependant, la perte de ces foci suite à l'arrêt de la transcription suggère que cette protéine joue un rôle durant la transcription.

De plus, le groupe du Dr. François Robert qui collabore avec nous sur ce projet a trouvé que cette protéine se lie à l'ARNm après la transcription du premier 500bp du gène avec l'aide de la technique ChIP-ChIP. Tous nos résultats pointent vers un rôle de Yhr127p durant la transcription. Nous sommes dans l'impossibilité de dire exactement qu'elle est le rôle de cette protéine pour le moment. Cependant, la concentration de ces protéines dans un ou plusieurs foci dans le nucléoplasme, et leur perte suite à l'arrêt de la transcription peut suggérer la présence de ces protéines dans des usines à transcription (transcription factories), mais aucune étude a montré jusqu'à maintenant la présence de ce type d'usines chez la levure *S. cerevisiae*. Toutefois, leur présence a été montrée chez les cellules mammifères<sup>183</sup> et curieusement, ces usines ressemblent à des foci dans le nucléoplasme.



## Conclusion et Perspectives

Isoler le porteur de l'information génétique loin du cytoplasme a forcés les cellules eucaryotes à créer un système qui va permettre à l'ARNm, synthétisé dans le noyau, d'être exporté vers le cytoplasme où il sera traduit en protéine. Cet ARNm passe à travers différents processus, de la transcription jusqu'à la dégradation (Figure 1), en passant par la maturation, l'export et la traduction. Au cours de ma maîtrise, nous avons étudié le processus d'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme.

Afin de mieux comprendre le comportement des ARNm dans le noyau, nous avons utilisé des techniques de molécules uniques pour détecter et suivre des ARNm dans des cellules fixes et vivantes. Nous avons remarqué que les ARNm bougent aléatoirement dans le nucléoplasme, mais « scannent » l'enveloppe nucléaire lorsqu'ils arrivent à la périphérie. Nous avons démontré que ce processus dépend des Myosin Like Proteins, Mlp1p et Mlp2p, composants essentiels du panier nucléaire et connectent également les pores nucléaires entre eux. De plus, nous avons découvert que ces ARNm « scannent » sur la partie C-terminale de Mlp1p. Ainsi, nous pensons que les ARNm « scannent » pour permettre à Yra1p d'être relâché de l'ARNm avant l'export de ce dernier.

Nous remarquons que, même si le site de transcription du gène *24PP7-GLT1* sous le contrôle du promoteur *GALI* est à la périphérie durant sa transcription, l'ARNm est relâché dans le nucléoplasme. Cependant, cette observation n'est pas forcément valable pour l'ARNm endogène *GALI*.

Finalement, nous avons enquêté sur le rôle d'une protéine nucléaire, appelée Yhr127p. Cette protéine, se lie à l'ARNm depuis sa naissance et voyage avec lui jusqu'au pore nucléaire. Perdre cette protéine ne provoque pas d'accumulation d'ARNm dans le noyau, mais cause une augmentation du nombre d'ARNm dans la cellule, peut-être à cause d'une augmentation du niveau de transcription. Yhr127p peut former des foci, et suite à un arrêt de la transcription, ces foci disparaissent du noyau.

Nos résultats montrent un rôle significatif de la périphérie nucléaire et du panier nucléaire sur la transcription et l'export des ARNm. Cependant, il reste à comprendre si la transcription au niveau de la périphérie nucléaire permet l'export direct des ARNm vers le cytoplasme ou non. Également, il faut regarder si d'autres ARNm, ayant leurs gènes transcrits à la périphérie (comme les heat shock genes), seront exportés directement vers le cytoplasme.

Concernant le « scanning », il faut savoir qu'elles sont les protéines liées à l'ARNm et impliquées dans ce processus. Prochainement, nous allons étudier l'effet de la perte de Mex67p, Yra1p et des protéines du complexe THO sur le « scanning ». Les nouveaux résultats obtenus devront nous aider à comprendre le rôle de chaque protéine impliquée dans ce processus, ce qui nous aidera à comprendre le mécanisme général de l'export des ARNm chez la levure *S. cerevisiae*.

Mes travaux au sein de l'équipe du Dr. Zenklusen ont contribué à une meilleure compréhension de l'export d'ARNm chez la levure. Une partie des facteurs nécessaires à ce processus semble relativement bien conservée chez l'ensemble des eucaryotes. Ainsi nos observations pourraient également ouvrir la voie vers une meilleure compréhension de l'export d'ARN chez les eucaryotes supérieurs, y compris chez l'humain.

Enfin, au sujet de Yhr127p. Cette protéine semble jouer un rôle durant la transcription ou sur la stabilité de l'ARNm. Avec nos collaborateurs, il faut continuer à enquêter sur le rôle de cette protéine en effectuant par exemple, des pullouts, pour connaître les protéines qui interagissent avec Yhr127p et peut-être mieux saisir quel est son rôle chez la levure.

# Bibliographies

1. Gaasterland, T. Archaeal genomics. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 542-547 (1999).
2. Allers, T. & Mevarech, M. Archaeal genetics [mdash] the third way. *Nat Rev Genet* **6**, 58-73 (2005).
3. Ulitsky, I. & Bartel, David P. lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell* **154**, 26-46.
4. Berretta, J. & Morillon, A. *Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation*, 973-982 (2009).
5. Dahm, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* **122**, 565-581 (2008).
6. Maderspacher, F. Theodor Boveri and the natural experiment. *Current Biology* **18**, R279-R286.
7. Hayes, B. 9. The significance of pneumococcal types Griffith F. J Hyg 1928; 27: 113&#8211;159. *Epidemiology & Infection* **133**, S31-S31 (2005).
8. Avery, O.T., Macleod, C.M. & McCarty, M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *The Journal of experimental medicine* **79**, 137-158 (1944).
9. Cooper, S. The central dogma of cell biology. *Cell Biology International Reports* **5**, 539-549 (1981).
10. Bystricky, K., Laroche, T., van Houwe, G., Blaszczyk, M. & Gasser, S.M. Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *The Journal of Cell Biology* **168**, 375-387 (2005).
11. Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W. & Nomura, M. Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 2441-2455 (1993).
12. Meneghini, M.D., Wu, M. & Madhani, H.D. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* **112**, 725-736 (2003).
13. Babiarz, J.E., Halley, J.E. & Rine, J. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **20**, 700-710 (2006).
14. Rodley, C.D.M., Bertels, F., Jones, B. & O'Sullivan, J.M. Global identification of yeast chromosome interactions using Genome conformation capture. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 879-886 (2009).
15. Berger, A.B. et al. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Meth* **5**, 1031-1037 (2008).
16. Heun, P., Laroche, T., Shimada, K., Furrer, P. & Gasser, S.M. Chromosome Dynamics in the Yeast Interphase Nucleus. *Science* **294**, 2181-2186 (2001).
17. Taddei, A. Active genes at the nuclear pore complex. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 305-310 (2007).
18. Akhtar, A. & Gasser, S.M. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* **8**, 507-517 (2007).
19. Dieppois, G., Iglesias, N. & Stutz, F. Cotranscriptional Recruitment to the mRNA Export Receptor Mex67p Contributes to Nuclear Pore Anchoring of Activated Genes. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 7858-7870 (2006).

20. Bystricky, K. et al. Regulation of Nuclear Positioning and Dynamics of the Silent Mating Type Loci by the Yeast Ku70/Ku80 Complex. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 835-848 (2009).
21. Collins, S.R. et al. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**, 806-810 (2007).
22. Wang, R. & Brattain, M.G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60&#xa0;kDa. *FEBS Letters* **581**, 3164-3170 (2007).
23. Wozniak, R.W., Rout, M.P. & Aitchison, J.D. Karyopherins and kissing cousins. *Trends in Cell Biology* **8**, 184-188 (1998).
24. Rout, M.P., Aitchison, J.D., Magnasco, M.O. & Chait, B.T. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends in Cell Biology* **13**, 622-628 (2003).
25. Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M. & Rout, M.P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 490-501 (2010).
26. Pemberton, L.F. & Paschal, B.M. Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. *Traffic* **6**, 187-198 (2005).
27. Wentz, S.R. & Rout, M.P. The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(2010).
28. Stewart, M. Nuclear Trafficking. *Science* **302**, 1513-1514 (2003).
29. Rout, M.P. et al. The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism. *The Journal of Cell Biology* **148**, 635-652 (2000).
30. Miller, G. & Hahn, S. A DNA-tethered cleavage probe reveals the path for promoter DNA in the yeast preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 603-610 (2006).
31. Cramer, P. et al. Structure of Eukaryotic RNA Polymerases. *Annual Review of Biophysics* **37**, 337-352 (2008).
32. Biddick, R. & Young, E.T. Yeast Mediator and its role in transcriptional regulation. *Comptes Rendus Biologies* **328**, 773-782 (2005).
33. Buratowski, S. Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Molecular Cell* **36**, 541-546 (2009).
34. Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L. & Kornberg, R.D. Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIF. *Cell* **79**, 1103-1109 (1994).
35. Akhtar, M.S. et al. TFIIF Kinase Places Bivalent Marks on the Carboxy-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Molecular Cell* **34**, 387-393 (2009).
36. Hahn, S. & Young, E.T. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics* **189**, 705-736 (2011).
37. Kuehner, J.N., Pearson, E.L. & Moore, C. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 283-294 (2011).
38. Luo, W., Johnson, A.W. & Bentley, D.L. The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes & Development* **20**, 954-965 (2006).
39. Lunde, B.M. et al. Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1195-1201 (2010).
40. Kim, M. et al. The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* **432**, 517-522 (2004).
41. West, S., Gromak, N. & Proudfoot, N.J. Human 5[prime] [rarr] 3[prime] exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* **432**, 522-525 (2004).

42. Rout, M.P. & Blobel, G. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **123**, 771-783 (1993).
43. Fahrenkrog, B., Hurt, E.C., Aebi, U. & Panté, N. Molecular Architecture of the Yeast Nuclear Pore Complex: Localization of Nsp1p Subcomplexes. *The Journal of Cell Biology* **143**, 577-588 (1998).
44. Kiseleva, E. et al. Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *Journal of Structural Biology* **145**, 272-288 (2004).
45. Alber, F. et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**, 695-701 (2007).
46. Onischenko, E., Stanton, L.H., Madrid, A.S., Kieselbach, T. & Weis, K. Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *The Journal of Cell Biology* **185**, 475-491 (2009).
47. Miao, M., Ryan, K.J. & Wente, S.R. The Integral Membrane Protein Pom34p Functionally Links Nucleoporin Subcomplexes. *Genetics* **172**, 1441-1457 (2006).
48. Chial, H.J., Rout, M.P., Giddings, T.H. & Winey, M. *Saccharomyces cerevisiae* Ndc1p Is a Shared Component of Nuclear Pore Complexes and Spindle Pole Bodies. *The Journal of Cell Biology* **143**, 1789-1800 (1998).
49. Lau, C.K., Giddings, T.H. & Winey, M. A Novel Allele of *Saccharomyces cerevisiae* NDC1 Reveals a Potential Role for the Spindle Pole Body Component Ndc1p in Nuclear Pore Assembly. *Eukaryotic Cell* **3**, 447-458 (2004).
50. Aitchison, J.D., Rout, M.P., Marelli, M., Blobel, G. & Wozniak, R.W. Two novel related yeast nucleoporins Nup170p and Nup157p: complementation with the vertebrate homologue Nup155p and functional interactions with the yeast nuclear pore-membrane protein Pom152p. *The Journal of Cell Biology* **131**, 1133-1148 (1995).
51. Tcheperegine, S.E., Marelli, M. & Wozniak, R.W. Topology and Functional Domains of the Yeast Pore Membrane Protein Pom152p. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 5252-5258 (1999).
52. Siniosoglou, S. et al. A Novel Complex of Nucleoporins, Which Includes Sec13p and a Sec13p Homolog, Is Essential for Normal Nuclear Pores. *Cell* **84**, 265-275 (1996).
53. Siniosoglou, S. et al. Structure and Assembly of the Nup84p Complex. *The Journal of Cell Biology* **149**, 41-54 (2000).
54. Kampmann, M. & Blobel, G. Three-dimensional structure and flexibility of a membrane-coating module of the nuclear pore complex. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 782-788 (2009).
55. Fernandez-Martinez, J. et al. Structure–function mapping of a heptameric module in the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **196**, 419-434 (2012).
56. Lutzmann, M., Kunze, R., Buerer, A., Aebi, U. & Hurt, E. *Modular self-assembly of a Y-shaped multiprotein complex from seven nucleoporins*, 387-397 (2002).
57. Li, O. et al. Mutation or deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT3/NUP133 gene causes temperature-dependent nuclear accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA and constitutive clustering of nuclear pore complexes. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 401-417 (1995).
58. Pemberton, L.F., Rout, M.P. & Blobel, G. Disruption of the nucleoporin gene NUP133 results in clustering of nuclear pore complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 1187-1191 (1995).
59. Rout, M.P. & Wente, S.R. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends in Cell Biology* **4**, 357-365 (1994).

60. Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L. & Rexach, M. Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 2450-2455 (2003).
61. Lim, R.Y.H. et al. Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9512-9517 (2006).
62. Kraemer, D.M., Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G. & Rout, M.P. The Essential Yeast Nucleoporin NUP159 Is Located on the Cytoplasmic Side of the Nuclear Pore Complex and Serves in Karyopherin-mediated Binding of Transport Substrate. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 19017-19021 (1995).
63. Stelter, P. et al. Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex. *Nat Cell Biol* **9**, 788-796 (2007).
64. Montpetit, B. et al. A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP6 in mRNA export. *Nature* **472**, 238-242 (2011).
65. von Moeller, H., Basquin, C. & Conti, E. The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 247-254 (2009).
66. Minakhina, S., Myers, R., Druzhinina, M. & Steward, R. Crosstalk between the actin cytoskeleton and Ran-mediated nuclear transport. *BMC Cell Biology* **6**, 32 (2005).
67. Hutten, S., Wälde, S., Spillner, C., Hauber, J. & Kehlenbach, R.H. The nuclear pore component Nup358 promotes transportin-dependent nuclear import. *Journal of Cell Science* **122**, 1100-1110 (2009).
68. Balatsos, N.A.A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S. & Virtanen, A. Inhibition of mRNA Deadenylation by the Nuclear Cap Binding Complex (CBC). *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4517-4522 (2006).
69. Furuichi, Y., LaFiandra, A. & Shatkin, A.J. 5[prime]-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**, 235-239 (1977).
70. Straszer, K. et al. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304-308 (2002).
71. Johnson, S.A., Cubberley, G. & Bentley, D.L. Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factor Yra1 by Direct Interaction with the 3' End Processing Factor Pcf11. *Molecular Cell* **33**, 215-226 (2009).
72. Huertas, P. & Aguilera, A. Cotranscriptionally Formed DNA:RNA Hybrids Mediate Transcription Elongation Impairment and Transcription-Associated Recombination. *Molecular Cell* **12**, 711-721 (2003).
73. Gómez-González, B. et al. *Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles*, 3106-3119 (2011).
74. Gilbert, W. & Guthrie, C. The Glc7p Nuclear Phosphatase Promotes mRNA Export by Facilitating Association of Mex67p with mRNA. *Molecular Cell* **13**, 201-212 (2004).
75. Sträßler, K., Baßler, J. & Hurt, E. Binding of the Mex67p/Mtr2p Heterodimer to Fxfg, GIfg, and Fg Repeat Nucleoporins Is Essential for Nuclear mRNA Export. *The Journal of Cell Biology* **150**, 695-706 (2000).
76. Zenklusen, D. & Stutz, F. Nuclear export of mRNA. *FEBS Letters* **498**, 150-156 (2001).
77. Reed, R. & Hurt, E. A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell* **108**, 523-531 (2002).

78. Rondón, A.G., Jimeno, S., García-Rubio, M. & Aguilera, A. Molecular Evidence That the Eukaryotic THO/TREX Complex Is Required for Efficient Transcription Elongation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 39037-39043 (2003).
79. Chávez, S. et al. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **19**, 5824-5834 (2000).
80. Rougemaille, M. et al. THO/Sub2p Functions to Coordinate 3'-End Processing with Gene-Nuclear Pore Association. *Cell* **135**, 308-321 (2008).
81. Oeffinger, M. & Zenklusen, D. To the pore and through the pore: A story of mRNA export kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 494-506 (2012).
82. Anderson, J.T., Wilson, S.M., Datar, K.V. & Swanson, M.S. NAB2: a yeast nuclear polyadenylated RNA-binding protein essential for cell viability. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 2730-2741 (1993).
83. Hector, R.E. et al. Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *The EMBO Journal* **21**, 1800-1810 (2002).
84. Kelly, S.M. et al. Recognition of Polyadenosine RNA by the Zinc Finger Domain of Nuclear Poly(A) RNA-binding Protein 2 (Nab2) Is Required for Correct mRNA 3'-End Formation\*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 26022-26032 (2010).
85. Siebrasse, J.P. et al. Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20291-20296 (2008).
86. Vargas, D.Y., Raj, A., Marras, S.A.E., Kramer, F.R. & Tyagi, S. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17008-17013 (2005).
87. Shav-Tal, Y. et al. Dynamics of Single mRNPs in Nuclei of Living Cells. *Science* **304**, 1797-1800 (2004).
88. Grünwald, D., Spottke, B., Buschmann, V. & Kubitscheck, U. Intranuclear Binding Kinetics and Mobility of Single Native U1 snRNP Particles in Living Cells. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 5017-5027 (2006).
89. Mor, A. et al. Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nat Cell Biol* **12**, 543-552 (2010).
90. Daneholt, B. Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 7012-7017 (2001).
91. Grunwald, D. & Singer, R.H. In vivo imaging of labelled endogenous [bgr]-actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature* **467**, 604-607 (2010).
92. Grunwald, D., Singer, R.H. & Rout, M. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature* **475**, 333-341 (2011).
93. Ledoux, S. & Guthrie, C. Regulation of the Dbp5 ATPase cycle in mRNP remodeling at the nuclear pore: a lively new paradigm for DEAD-box proteins. *Genes & Development* **25**, 1109-1114 (2011).
94. Lund, M.K. & Guthrie, C. The DEAD-Box Protein Dbp5p Is Required to Dissociate Mex67p from Exported mRNPs at the Nuclear Rim. *Molecular Cell* **20**, 645-651 (2005).
95. Noble, K.N. et al. The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export II: nucleotide cycling and mRNP remodeling by Dbp5 are controlled by Nup159 and Gle1. *Genes & Development* **25**, 1065-1077 (2011).



96. Cole, C.N. & Scarcelli, J.J. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 299-306 (2006).
97. Tran, E.J., Zhou, Y., Corbett, A.H. & Wenthe, S.R. The DEAD-Box Protein Dbp5 Controls mRNA Export by Triggering Specific RNA:Protein Remodeling Events. *Molecular Cell* **28**, 850-859 (2007).
98. Strahm, Y. et al. *The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr255p*, 5761-5777 (1999).
99. Saavedra, C.A., Hammell, C.M., Heath, C.V. & Cole, C.N. Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes & Development* **11**, 2845-2856 (1997).
100. Zheng, C. et al. Structural Basis for the Function of the *Saccharomyces cerevisiae* Gfd1 Protein in mRNA Nuclear Export. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 20704-20715 (2010).
101. Kölling, R., Nguyen, T., Chen, E. & Botstein, D. A new yeast gene with a myosin-like heptad repeat structure. *Molecular and General Genetics MGG* **237**, 359-369 (1993).
102. Watts, F.Z., Miller, D.M. & Orr, E. Identification of myosin heavy chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **316**, 83-85 (1985).
103. Drubin, D.G., Miller, K.G. & Botstein, D. Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* **107**, 2551-2561 (1988).
104. Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G. & Rout, M.P. Proteins Connecting the Nuclear Pore Complex with the Nuclear Interior. *The Journal of Cell Biology* **144**, 839-855 (1999).
105. Frasch, M., Paddy, M. & Saumweber, H. Developmental and mitotic behaviour of two novel groups of nuclear envelope antigens of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* **90**, 247-263 (1988).
106. Mitchell, P.J. & Cooper, C.S. The human tpr gene encodes a protein of 2094 amino acids that has extensive coiled-coil regions and an acidic C-terminal domain. *Oncogene* **7**, 2329-2333 (1992).
107. Byrd, D.A. et al. Tpr, a large coiled coil protein whose amino terminus is involved in activation of oncogenic kinases, is localized to the cytoplasmic surface of the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology* **127**, 1515-1526 (1994).
108. Zimowska, G., Aris, J.P. & Paddy, M.R. A *Drosophila* Tpr protein homolog is localized both in the extrachromosomal channel network and to nuclear pore complexes. *Journal of Cell Science* **110**, 927-944 (1997).
109. Kosova, B. et al. Mlp2p, A Component of Nuclear Pore Attached Intranuclear Filaments, Associates with Nic96p. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 343-350 (2000).
110. Niepel, M. et al. The nuclear basket proteins Mlp1p and Mlp2p are part of a dynamic interactome including Esc1p and the proteasome. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 3920-3938 (2013).
111. Krull, S., Thyberg, J., Björkroth, B., Rackwitz, H.-R. & Cordes, V.C. Nucleoporins as Components of the Nuclear Pore Complex Core Structure and Tpr as the Architectural Element of the Nuclear Basket. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 4261-4277 (2004).
112. Carmody, S.R., Tran, E.J., Apponi, L.H., Corbett, A.H. & Wenthe, S.R. The Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2 Regulates Nuclear Retention of Non-Heat Shock mRNAs during Heat Shock-Induced Stress. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 5168-5179 (2010).
113. Feuerbach, F. et al. Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 214-221 (2002).

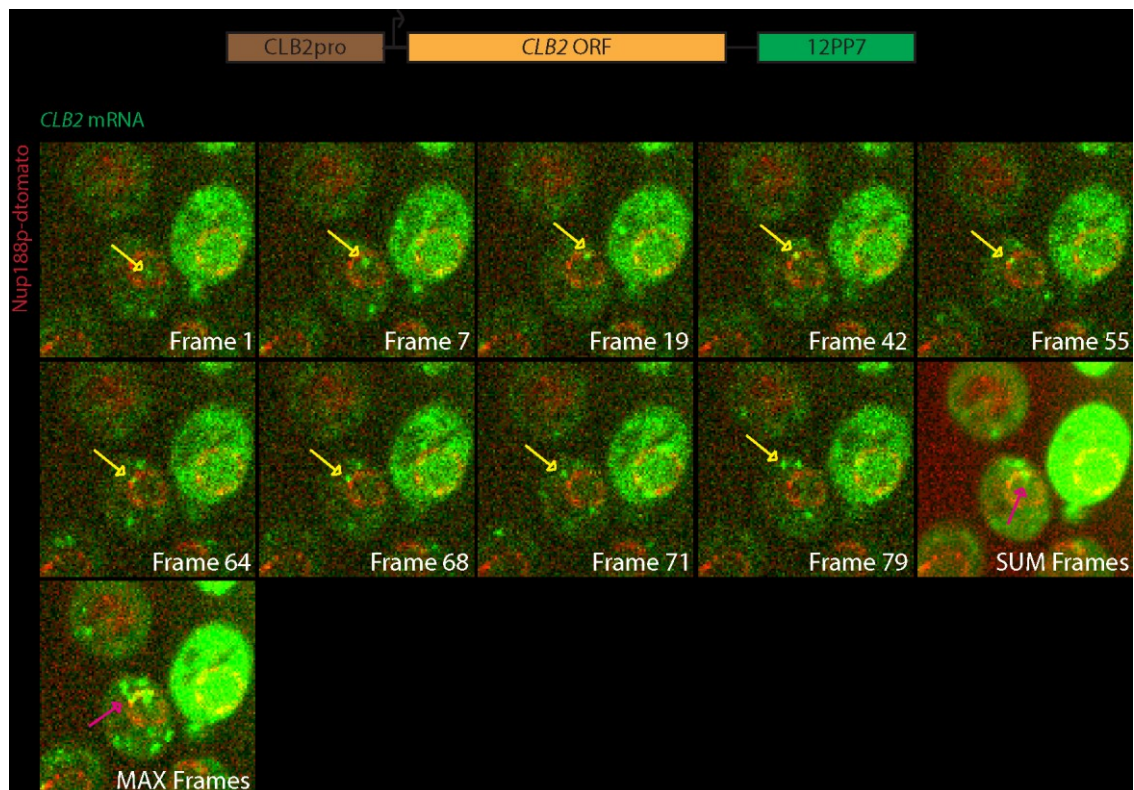
114. Galy, V. et al. Nuclear Retention of Unspliced mRNAs in Yeast Is Mediated by Perinuclear Mlp1. *Cell* **116**, 63-73 (2004).
115. Scott, R.J., Lusk, C.P., Dilworth, D.J., Aitchison, J.D. & Wozniak, R.W. Interactions between Mad1p and the Nuclear Transport Machinery in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 4362-4374 (2005).
116. Lewis, A., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M. A nuclear envelope protein linking nuclear pore basket assembly, SUMO protease regulation, and mRNA surveillance. *The Journal of Cell Biology* **178**, 813-827 (2007).
117. Lei, E.P., Krebber, H. & Silver, P.A. Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes & Development* **15**, 1771-1782 (2001).
118. Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.-C. & Stutz, F. Stable mRNP Formation and Export Require Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 8241-8253 (2002).
119. Iglesias, N. et al. Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes & Development* **24**, 1927-1938 (2010).
120. Aguilera, A. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 242-250 (2005).
121. Niepel, M., Strambio-de-Castillia, C., Fasolo, J., Chait, B.T. & Rout, M.P. The nuclear pore complex-associated protein, Mlp2p, binds to the yeast spindle pole body and promotes its efficient assembly. *The Journal of Cell Biology* **170**, 225-235 (2005).
122. Palancade, B., Zuccolo, M., Loeillet, S., Nicolas, A. & Doye, V. Pml39, a Novel Protein of the Nuclear Periphery Required for Nuclear Retention of Improper Messenger Ribonucleoproteins. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 5258-5268 (2005).
123. Andrulis, E.D. et al. Esc1, a Nuclear Periphery Protein Required for Sir4-Based Plasmid Anchoring and Partitioning. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 8292-8301 (2002).
124. Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C. & Gasser, S.M. Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *The EMBO Journal* **23**, 1301-1312 (2004).
125. Hattier, T., Andrulis, E. & Tartakoff, A. Immobility, inheritance and plasticity of shape of the yeast nucleus. *BMC Cell Biology* **8**, 47 (2007).
126. Skružný, M. et al. An Endoribonuclease Functionally Linked to Perinuclear mRNP Quality Control Associates with the Nuclear Pore Complexes. *PLoS Biol* **7**, e1000008 (2009).
127. Pasupala, N., Easwaran, S., Hannan, A., Shore, D. & Mishra, K. The SUMO E3 Ligase Siz2 Exerts a Locus-Dependent Effect on Gene Silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **11**, 452-462 (2012).
128. Green, D.M., Johnson, C.P., Hagan, H. & Corbett, A.H. The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1010-1015 (2003).
129. Green, D.M. et al. Nab2p Is Required for Poly(A) RNA Export in *Saccharomyces cerevisiae* and Is Regulated by Arginine Methylation via Hmt1p. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7752-7760 (2002).
130. Kelly, S.M. et al. Recognition of polyadenosine RNA by zinc finger proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12306-12311 (2007).
131. Batisse, J., Batisse, C., Budd, A., Böttcher, B. & Hurt, E. Purification of Nuclear Poly(A)-binding Protein Nab2 Reveals Association with the Yeast Transcriptome and a Messenger Ribonucleoprotein Core Structure. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 34911-34917 (2009).

132. Marfatia, K.A., Crafton, E.B., Green, D.M. & Corbett, A.H. Domain Analysis of the Saccharomyces cerevisiae Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein, Nab2p: DISSECTING THE REQUIREMENTS FOR Nab2p-FACILITATED POLY(A) RNA EXPORT. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6731-6740 (2003).
133. Fasken, M.B., Stewart, M. & Corbett, A.H. Functional Significance of the Interaction between the mRNA-binding Protein, Nab2, and the Nuclear Pore-associated Protein, Mlp1, in mRNA Export. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 27130-27143 (2008).
134. Galy, V. et al. Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**, 108-112 (2000).
135. Laroche, T. et al. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Current Biology* **8**, 653-657 (1998).
136. Gravel, S., Larrivée, M., Labrecque, P. & Wellinger, R.J. Yeast Ku as a Regulator of Chromosomal DNA End Structure. *Science* **280**, 741-744 (1998).
137. Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B. & Weaver, D.T. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 4189-98 (1996).
138. Moore, J.K. & Haber, J.E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 2164-73 (1996).
139. Barnes, G. & Rio, D. DNA double-strand-break sensitivity, DNA replication, and cell cycle arrest phenotypes of Ku-deficient Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 867-872 (1997).
140. Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B. & Petes, T.D. The DNA-binding Protein Hdf1p (a Putative Ku Homologue) Is Required for Maintaining Normal Telomere Length in Saccharomyces Cerevisiae. *Nucleic Acids Research* **24**, 582-585 (1996).
141. *Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing*, 1819-1828 (1998).
142. Nugent, C.I. et al. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Current Biology* **8**, 657-662 (1998).
143. Polotnianka, R.M., Li, J. & Lustig, A.J. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Current Biology* **8**, 831-835 (1998).
144. Hediger, F., Dubrana, K. & Gasser, S.M. Myosin-like proteins 1 and 2 are not required for silencing or telomere anchoring, but act in the Tel1 pathway of telomere length control. *Journal of Structural Biology* **140**, 79-91 (2002).
145. Hackmann, A. et al. Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nat Commun* **5**(2014).
146. Häcker, S. & Krebber, H. Differential Export Requirements for Shuttling Serine/Arginine-type mRNA-binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5049-5052 (2004).
147. *Identification of Gbp2 as a novel poly(A)+ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast*, 278-283 (2003).
148. Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D. & Stutz, F. Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *The EMBO Journal* **24**, 813-823 (2005).
149. Schmid, M. et al. Nup-PI: The Nucleopore-Promoter Interaction of Genes in Yeast. *Molecular Cell* **21**, 379-391 (2006).

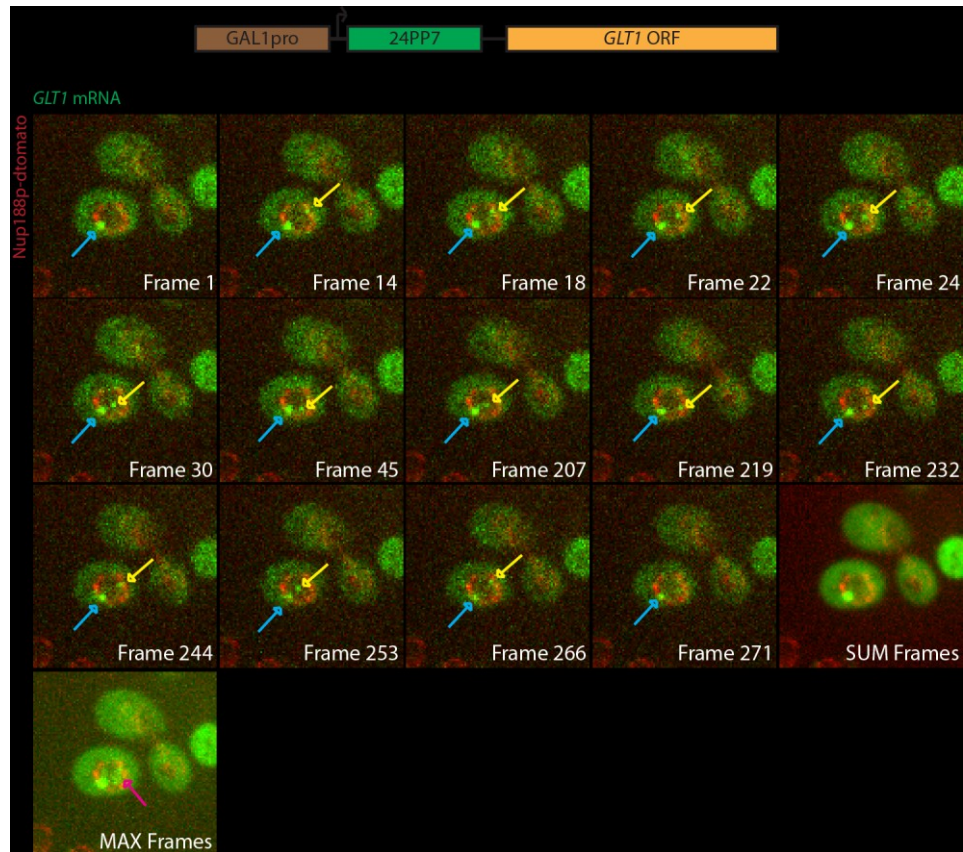
150. Cabal, G.G. et al. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**, 770-773 (2006).
151. Brickner, J.H. & Walter, P. Gene Recruitment of the Activated *INO1* Locus to the Nuclear Membrane. *PLoS Biol* **2**, e342 (2004).
152. Taddei, A., Schober, H. & Gasser, S.M. The Budding Yeast Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(2010).
153. Rodríguez-Navarro, S. et al. Sus1, a Functional Component of the SAGA Histone Acetylase Complex and the Nuclear Pore-Associated mRNA Export Machinery. *Cell* **116**, 75-86 (2004).
154. Rodríguez-Navarro, S. & Hurt, E. Linking gene regulation to mRNA production and export. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 302-309 (2011).
155. Holstege, F.C.P. et al. Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell* **95**, 717-728 (1998).
156. Basehoar, A.D., Zanton, S.J. & Pugh, B.F. Identification and Distinct Regulation of Yeast TATA Box-Containing Genes. *Cell* **116**, 699-709 (2004).
157. Luthra, R. et al. Actively Transcribed GAL Genes Can Be Physically Linked to the Nuclear Pore by the SAGA Chromatin Modifying Complex. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 3042-3049 (2007).
158. Blobel, G. Gene gating: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 8527-8529 (1985).
159. Casolari, J.M. et al. Genome-Wide Localization of the Nuclear Transport Machinery Couples Transcriptional Status and Nuclear Organization. *Cell* **117**, 427-439 (2004).
160. Kurshakova, M.M. et al. SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *The EMBO Journal* **26**, 4956-4965 (2007).
161. Wickramasinghe, V.O. et al. mRNA Export from Mammalian Cell Nuclei Is Dependent on GANP. *Current Biology* **20**, 25-31 (2010).
162. Yao, G. et al. PAB1 Self-Association Precludes Its Binding to Poly(A), Thereby Accelerating CCR4 Deadenylation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 6243-6253 (2007).
163. Oeffinger, M. et al. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Meth* **4**, 951-956 (2007).
164. Powrie, E.A., Zenklusen, D. & Singer, R.H. A nucleoporin, Nup60p, affects the nuclear and cytoplasmic localization of ASH1 mRNA in *S. cerevisiae*. *RNA* **17**, 134-144 (2011).
165. Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Strahm, Y. & Stutz, F. The Yeast hnRNP-Like Proteins Yra1p and Yra2p Participate in mRNA Export through Interaction with Mex67p. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4219-4232 (2001).
166. Zenklusen, D. & Singer, R.H. Chapter 26 - Analyzing mRNA Expression Using Single mRNA Resolution Fluorescent In Situ Hybridization. in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 470 (eds. Jonathan, W., Christine, G. & Gerald, R.F.) 641-659 (Academic Press, 2010).
167. Larson, D.R., Singer, R.H. & Zenklusen, D. A single molecule view of gene expression. *Trends in Cell Biology* **19**, 630-637 (2009).
168. Larson, D.R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J.A. & Singer, R.H. Real-Time Observation of Transcription Initiation and Elongation on an Endogenous Yeast Gene. *Science* **332**, 475-478 (2011).
169. Bertrand, E. et al. Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast. *Molecular Cell* **2**, 437-445 (1998).
170. Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J.A. & Singer, R.H. Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nat Meth* **10**, 119-121 (2013).

171. Schmid, M. & Jensen, T.H. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **1**, 474-485 (2010).
172. Thompson, R.E., Larson, D.R. & Webb, W.W. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal* **82**, 2775-2783 (2002).
173. Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P. & González, A. Regulation of Expression of GLT1, the Gene Encoding Glutamate Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **180**, 3533-3540 (1998).
174. Surana, U. et al. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **65**, 145-161 (1991).
175. Nissan, T.A. et al. A Pre-Ribosome with a Tadpole-like Structure Functions in ATP-Dependent Maturation of 60S Subunits. *Molecular Cell* **15**, 295-301 (2004).
176. Wang, Y.M. et al. Single-molecule studies of repressor–DNA interactions show long-range interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9796-9801 (2005).
177. Winey, M., Yarar, D., Giddings, T.H., Jr. & Mastronarde, D.N. Nuclear Pore Complex Number and Distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle by Three-Dimensional Reconstruction from Electron Micrographs of Nuclear Envelopes. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2119-2132 (1997).
178. Kalkum, M., Lyon, G.J. & Chait, B.T. Detection of secreted peptides by using hypothesis-driven multistage mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 2795-2800 (2003).
179. Bernstein, K.A., Gallagher, J.E.G., Mitchell, B.M., Granneman, S. & Baserga, S.J. The Small-Subunit Processome Is a Ribosome Assembly Intermediate. *Eukaryotic Cell* **3**, 1619-1626 (2004).
180. Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Gélugne, J.P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs, 4770-4776 (1997).
181. Bullitt, E., Rout, M.P., Kilmartin, J.V. & Akey, C.W. The Yeast Spindle Pole Body Is Assembled around a Central Crystal of Spc42p. *Cell* **89**, 1077-1086 (1997).
182. Schmid, M. et al. Rrp6p Controls mRNA Poly(A) Tail Length and Its Decoration with Poly(A) Binding Proteins. *Molecular Cell* **47**, 267-280 (2012).
183. Wansink, D. et al. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *The Journal of Cell Biology* **122**, 283-293 (1993).
184. Burkard, K.T.D. & Butler, J.S. A Nuclear 3'-5' Exonuclease Involved in mRNA Degradation Interacts with Poly(A) Polymerase and the hnRNA Protein Npl3p. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 604-616 (2000).
185. Texari, L. et al. The Nuclear Pore Regulates GAL1 Gene Transcription by Controlling the Localization of the SUMO Protease Ulp1. *Molecular Cell* **51**, 807-818 (2013).
186. Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervey, D. & Vogelauer, M. A ncRNA Modulates Histone Modification and mRNA Induction in the Yeast GAL Gene Cluster. *Molecular Cell* **32**, 685-695.

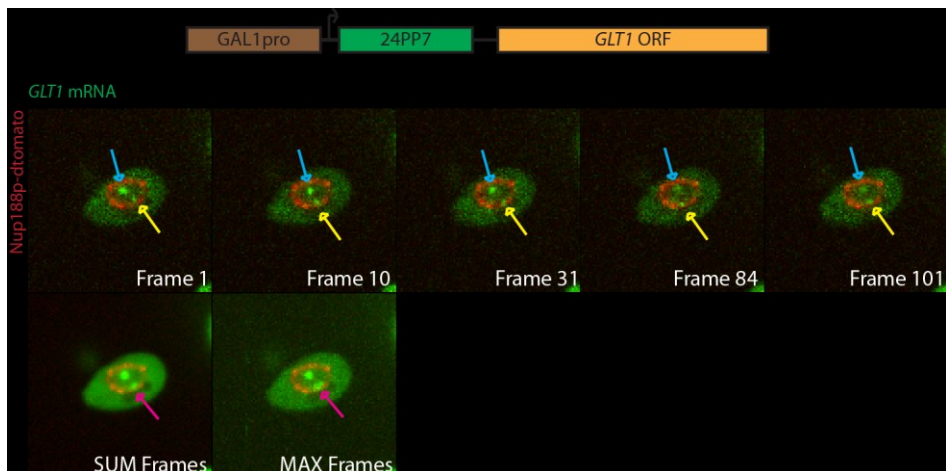
## Figures en supplémentaires



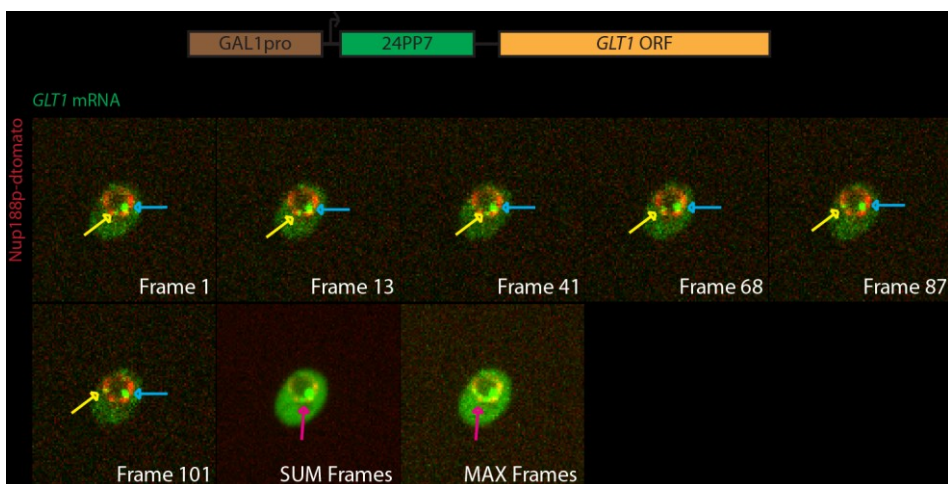
**Figure S1: *CLB2*-12PP7 mRNA exported to the cytoplasm after scanning the nuclear envelope.** Series of images showing single *CLB2*-12PP7 (yellow arrows). Movies were acquired at 37 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + glucose at 30°C. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with 2xmCherry, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 79 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 79 frames for movie.



**Figure S2: Deleting *NUP60* abolishes scanning of 24PP7-*GLT1*-12PP7 mRNA at the periphery.** Series of images showing single 24PP7-*GLT1* mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 271 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 271 frames for movie.

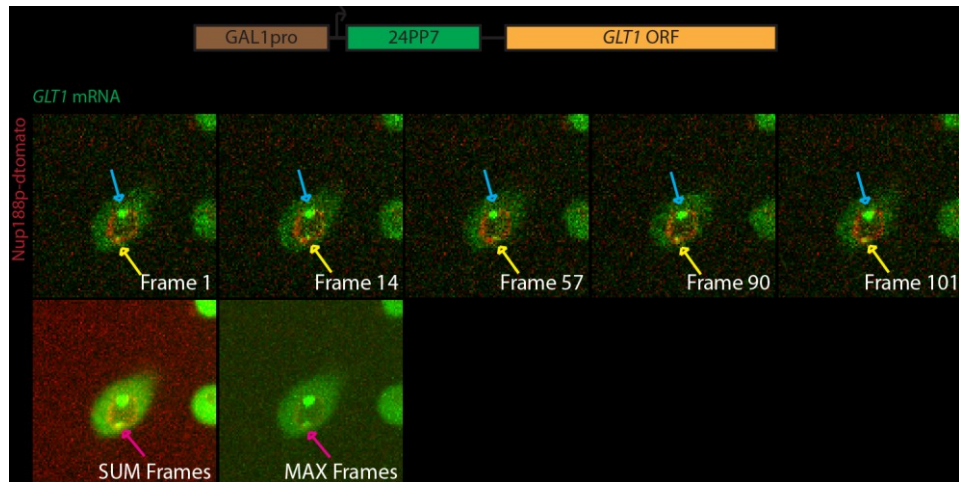


**Figure S3: 24PP7-GLT1-12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a *nab2F73D* mutant.** Series of images showing single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 101 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 101 frames for movie.

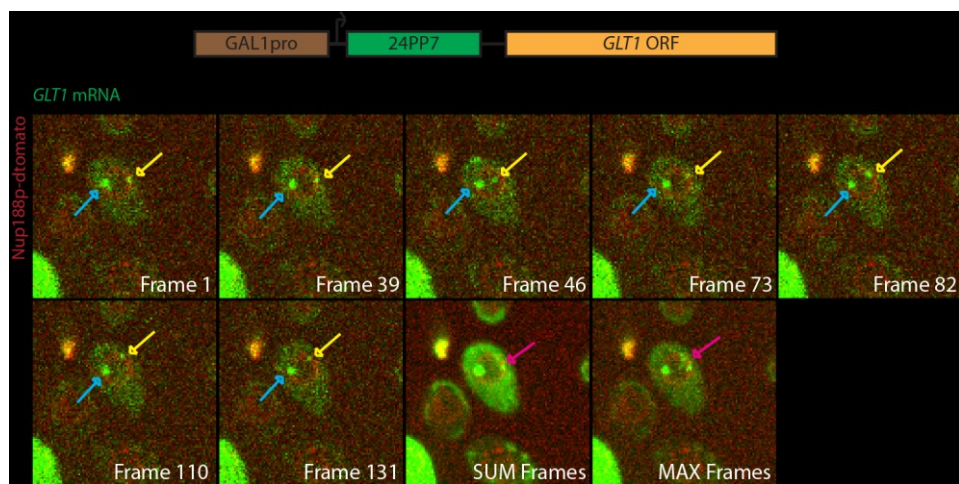


**Figure S4: 24PP7-GLT1-12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in  $\Delta tom1$  cells.** Series of images showing single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 25°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 101 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 101 frames for movie.

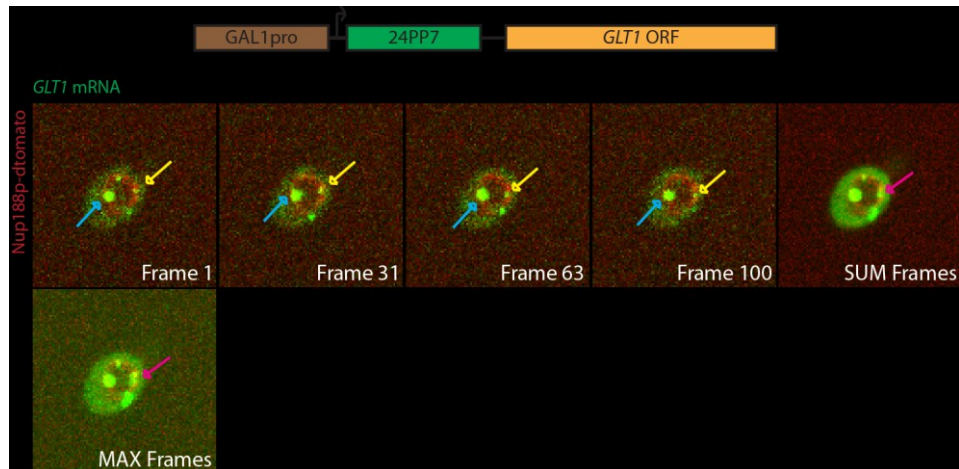




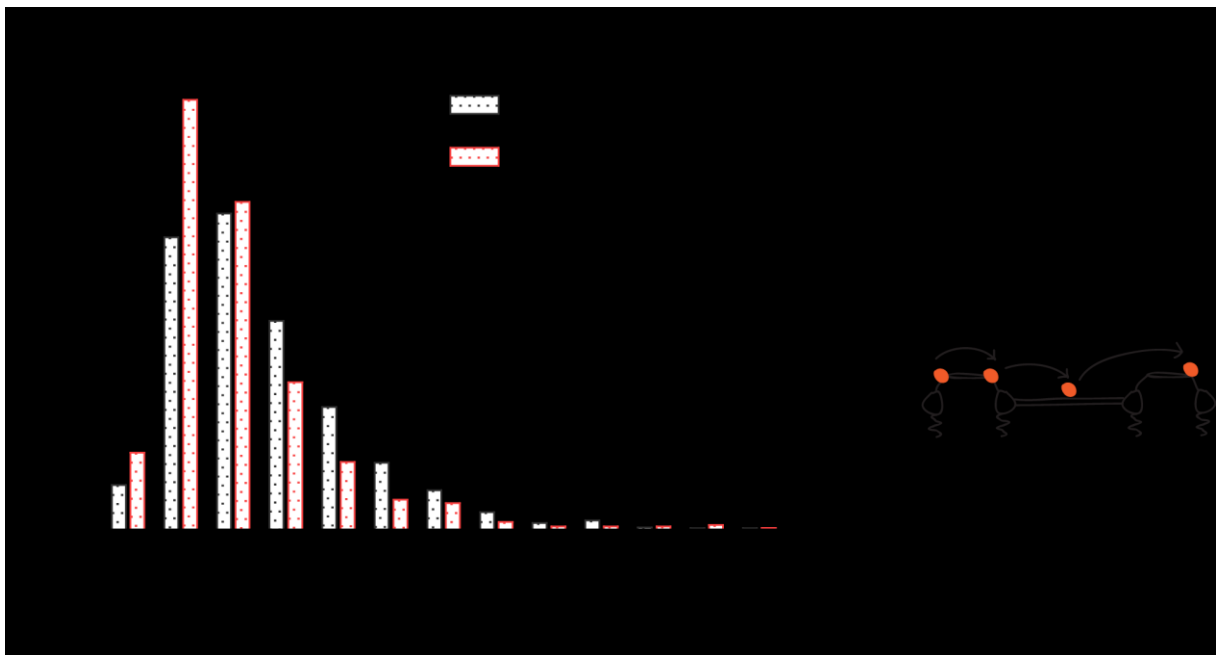
**Figure S5: 24PP7-GLT1-12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in  $\Delta sto1$  cells.** Series of images showing single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 101 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 101 frames for movie.



**Figure S6: 24PP7-GLT1-12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a  $\Delta pm11$  cells.** Series of images showing single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 131 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 131 frames for movie.



**Figure S7: 24PP7-GLT1-12PP7 mRNA still scans the nuclear periphery in a  $\Delta pm139$  cells.** Series of images showing single 24PP7-GLT1 mRNA (yellow arrows). Movies were acquired at 18.5 milliseconds per frame. Cells were grown in SD + raffinose at 30°C before induction with galactose. The nuclear envelope shown in red by tagging Nup188p with dtomato, PP7-GFP labeled mRNA is shown in green. SUM frames indicate sum intensity projection of 100 frames and MAX frames indicates maximum intensity projection of 100 frames for movie.



**Figure S8: 24PP7 GLT1 mRNAs imaged at an interval of 18.5ms and 37ms behave similarly.** Frequency distribution of the distances 24PP7 GLT1 mRNAs travel when scanning at the periphery in 18.5ms (red) and 37ms (black) (from one frame of the movie to the other). 156 24xPP7 GLT1 mRNAs (37ms) and 73 GLT1 12xPP7 mRNAs were tracked.

## Annexe

| Background | Description  | Génotype   |
|------------|--|--|
| BY4741     | WT   | MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0  |
| BY4742     | WT   | MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0   |
| BY4743     | WT   | MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0<br>LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15<br>ura3Δ0/ura3Δ0                                   |
| w303a      | WT   | MATa his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1<br>ade2-1 can1-100   |
| BY4743     | WT GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> + <i>Nup188</i> -<br>dtomato + Met25p-PP7-GFP                            | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, pURA-PP7-GFP                               |
| W303       | WT MDN1p- <i>MDN1</i> -12PP7 + <i>Nup188</i> -<br>2xmCherry + ADE3p-PP7-GFP                          | MATa/α MDN1p- <i>MDN1</i> -12PP7:KANMX<br>(loxp), <i>NUP188</i> -2xmCherry:KANMX, pURA-<br>PP7-GFP                 |
| W303       | WT CLB2p- <i>CLB2</i> -12PP7 + <i>Nup188</i> -<br>2xmCherry + ADE3p-PP7-GFP                          | MATa/α CLB2p- <i>CLB2</i> -12PP7:KANMX(loxp),<br><i>NUP188</i> -2xmCherry:KANMX, pURA-PP7-GFP                      |
| W303       | Δ <i>mpl1/2</i> GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP                 | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, pURA-PP7-GFP                               |
| w303       | Δ <i>Nup133</i> (301-1157) GAL1p-24PP7-<br><i>GLT1</i> + <i>Nup188</i> -dtomato + Met25p-<br>PP7-GFP | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, pURA-PP7-GFP                               |
| BY4743     | Δ <i>sto1</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + Met25p-PP7-GFP                | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, <i>STO1</i> ::HPH, pURA-PP7-GFP            |
| BY4743     | Δ <i>pml1</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP                 | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, <i>PML1</i> ::HPH, pURA-PP7-<br>GFP        |
| BY4743     | Δ <i>pml39</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP                | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, <i>PML39</i> ::HPH, pURA-PP7-<br>GFP       |
| BY4742     | Δ <i>nup60</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP                | MATα GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, <i>NUP60</i> ::HPH, pURA-PP7-<br>GFP         |
| w303       | Δ C-term <i>mpl1</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP          | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, C-term <i>MPL1</i> ::HPH, pURA-<br>PP7-GFP |
| BY4743     | <i>nab2F73D</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> +<br><i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP               | MATa/α GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -<br>dtomato:KANMX, <i>nab2F73D</i> ::HPH, pURA-<br>PP7-GFP    |

|        |  |  |
|--------|--|--|
| BY4742 | <i>Δtom1</i> + GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> + <i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP | MAT $\alpha$ GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -dtomato:KANMX, <i>TOM1</i> ::HPH, pURA-PP7-GFP        |
| BY4743 | WT GAL1p-12PP7- <i>GAL1</i> + <i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP             | MAT $\alpha$ / $\alpha$ GAL1p-12PP7- <i>GAL1</i> :KANMX (loxp), <i>NUP188</i> -dtomato:KANMX, pURA-PP7-GFP       |
| BY4743 | WT GAL1p- <i>GAL1</i> -12PP7 + <i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP            | MAT $\alpha$ / $\alpha$ GAL1p- <i>GAL1</i> -12PP7:KANMX (loxp), <i>NUP188</i> -dtomato:KANMX, pURA-PP7-GFP       |
| BY4743 | WT GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> -GAL1term + <i>Nup188</i> -dtomato + ADE3p-PP7-GFP   | MAT $\alpha$ / $\alpha$ GAL1p-24PP7- <i>GLT1</i> :HIS, <i>NUP188</i> -dtomato:KANMX, GAL1term:LEU2, pURA-PP7-GFP |
| w303   | WT YHR127p-GFP   | MAT $\alpha$ / $\alpha$ YHR127p-GFP:KANMX  |
| w303   | <i>Δyhr127</i>   | MAT $\alpha$ <i>yhr127</i> ::KANMX   |
| w303   | <i>rpb1-1</i> YHR127p-GFP  | MAT $\alpha$ YHR127p-GFP:KANMX   |

**Tableau S1** : Background, description et genotypes de chacune des souches utilisé

| Numéro et nom du primer               | Séquence du primer  |
|---------------------------------------|---|
| 511 his+ test rev                     | tcattagtgtacgggagata  |
| 839 <i>GLT1</i> insertion test fwd    | GACTGCTTATCAACAGATTCTG  |
| 995 <i>STO1</i> deletion fwd S1       | ATTCAGTTTCATTCAAATTAACATACCCAACTTTGACTACCTTGCAT<br>cgtacgctgcaggtcgac                     |
| 996 <i>STO1</i> deletion rev S2       | TAAAAATTAAGCGGAGTGATAACGAATGTAGTCCATCCTCCGAATCT<br>ATCGATGAATTCGAGCTCG                    |
| 997 <i>NUP60</i> deletion rev S2      | TACGTATTGAGTTGGGCTATACGGTAATTATGTCACGGCTAAAATTTCA<br>ATCGATGAATTCGAGCTCG                  |
| 1062 <i>NUP188</i> xfp fwd            | CAAGGGTATCAGCAGAGACATTAAGCATTACAAGATTCACCTATTTAAGGAC<br>GTT<br>GCT CTA GAA CTA GTG GAT CC |
| 1063 <i>NUP188</i> xfp rev            | GCACTTGCACTGTTTATTATTATATTATGTAGCTTTACATAACCTGCAAAATAA<br>G GCATAGGCCACTAGTGGATCTG        |
| 1274 <i>CLB2</i> pKAN RNA tagging fwd | AATGGGCTTTAAAGGTTAGAAAAACGGCTATGATATAATGACCTTGCATGA<br>ATGA GCT CTA GAA CTA GTG GAT CC    |
| 1275 <i>CLB2</i> pKAN tagging rev     | TATATGGACATTTATCGATTATCGTTTTAGATATTTAAGCATCTGCCCTCTT<br>C GCATAGGCCACTAGTGGATCTG          |

|   |  |
|---|--|
| 1248 tagging 3'<br>MDN1/pKAN fwd                | TTCACTGATTTTGCCTCAATACTTTACAGACCTGGCATCCAGCTAA<br>GCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCC              |
| 1249 tagging 3'<br>MDN1/pKAN rev                | CCTTTGATTCGTGTAGTAAACCTCCTCTTCTTGGTTTTACGATATA<br>GCATAGGCCACTAGTGGATCTG               |
| 1310 NUP60 deletion fwd                         | AGACCTTTACATCAAATAAGCACCGCAAGATATCCTAAAATCGACATCCA<br>cgtacgctgcaggtcgac               |
| 1360 Gal1 3' tagging<br>12xpp7 fwd              | AAATGCTATCATCGTCTCTAAACCAGCATTGGGCAGCTGTCTATATGAATTAT<br>AA GCT CTA GAA CTA GTG GAT CC |
| 1361 Gal1 3' tagging<br>12xpp7 rev              | ATGAGTAGAAAAAATGAGAAGTTGTTCTGAACAAAGTAAAAAAGAAGT<br>ATAC GCATAGGCCACTAGTGGATCTG        |
| 1362 Gal1 5' tagging<br>12xpp7 fwd              | AACAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAATA<br>TA GCT CTA GAA CTA GTG GAT CC   |
| 1363 Gal1 5' tagging<br>12xpp7 rev              | TTGCGCTAGAATTGAACTCAGGTACAATCACTTCTTCTGAATGAGATTTAGTC<br>AT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG     |
| 1378 GAL1 5' fwd test<br>insertion              | TAGGATGATAATGCGATTAG   |
| 1379 GAL1 5' rev test<br>insertion              | GCAAACCTTTCCGGTGAAG  |
| 1380 GAL1 3' fwd test<br>insertion              | CCAATGAGTTCTACAAGGTC   |
| 1381 GAL1 3' rev test<br>insertion              | TCTCGTCAGTTGGCAACTTG   |
| 1382 GAL10 5' fwd test<br>insertion             | CTGAAAGTTCAAAGAGAAG  |
| 1383 GAL10 5' rev test<br>insertion             | ATTGTGATAGTATCTCAGCG   |
| 1384 GAL10 3' fwd test<br>insertion             | TAGATACATTGATGCTATCA   |
| 1385 GAL10 3' rev test<br>insertion             | CCGTCCATATCTTTCCATAG   |
| 1399 Mlp1-2xcherry fwd                          | AATCAATTAATCTATTAAGAGAAAGTAACATAACATTGCGGAATGAGCTGG<br>AAAACAACATGCCAAAGAAGAAGAGAAAAG  |
| 1401 Mlp1-2xcherry term<br>insertion rev        | AAGCTCCTCCACATTGAAAAAGTTTGTATTGATCCCTTGTCTTTACTA<br>TCTCCTAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC        |
| 1424 GAL1term insertion<br>into GLT1 term fwd_2 | TCGTTCAACGTGATTACAACTATTGAAAGAATTAGCTAGTCAAGTCTAAGTA<br>TACTTCTTTTTTTACT               |
| 1423 GAL1term insertion<br>into GLT1 term rev_2 | TTGTCGTTGGTAGAGGTGGGGCAGGAAACATTTTCTTCAACAAAAAAGAA<br>CTGTGGGAATACTCAGGT               |
| 1475 Pml1 deletion 498<br>fwd                   | GCCACAGCAAGCATGGTGTACTTCATTTCCGACTCCATTTGCGTATAGAC<br>cgtacgctgcaggtcgac               |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1476 Pml1 deletion 498<br>rev  | TTCAAAGAAGAATAATTA AACACACTGAAAGTGTGTTTCTTATATATGGCAT<br>CGATGAATTCGAGCTCG                               |
| 1477 Pml39 deletion 498<br>fwd | AAATAAACATTATTC CCCAGGAATTGACAGGAAAGTAGGGCAGTTACTA<br>cgtacgctgcaggtcgac                                 |
| 1478 Pml39 deletion 498<br>rev | TGGGGGCATATACAAGCATATGAGAATTTGGATAATGTATTACATCTAATCAT<br>CGATGAATTCGAGCTCG                               |
| 1480 Nab2 F73D tagging<br>fwd  | AATCTGTCGTAGACGAGCTGGCTAGTTTGTTTGATAGTGTTCGAGAGATAC<br>GCTTGCAAATGTTGTTCAAACAGCCTTTGATGCATTAGAAGCTCTGCA  |
| 1481 Nab2 F73D tagging<br>rev  | CTTGTTGTCTACAAATTATAAAATAGTTTTTTATAATCAACCATTAAATAATTTT<br>GTACACTTATAATAACACTTTATTTTAGGCCACTAGTGGATCTGA |
| 1599 TOM1 deletion 498<br>fwd  | GAGAAAATAGTGCATATTTAGTTTACTTTTTGCCTTTGATTGAAAATATATATT<br>C cgtacgctgcaggtcgac                           |
| 1600 TOM1 deletion 498<br>rev  | AAAGACGTTCTAAAATACTTGGTTACATGGCGCTATAAATTTACACGAAAAAT<br>GACATCGATGAATTCGAGCTCG                          |

**Tableau S2** : Nom, numéro et séquence des primers utilisés pour construire ou tester les souches