

Université de Montréal

**La voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* :
une concertation entre Khd1, Puf6 et Loc1**

par
Amélie Forget

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biochimie

Mai 2014

© Amélie Forget, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* :
une concertation entre Khd1, Puf6 et Loc1

Présentée par :
Amélie Forget

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, président-rapporteur
Dr Pascal Chartrand, directeur de recherche
Dr Gilles Hickson, membre du jury

Résumé

La localisation des ARNm par transport dirigé joue un rôle dans le développement, la motilité cellulaire, la plasticité synaptique et la division cellulaire asymétrique. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la localisation d'ARNm est un phénomène dont les mécanismes de régulation sont conservés auprès de nombreux autres organismes. Lors de la division de la levure, plus d'une trentaine de transcrits sont localisés par transport actif à l'extrémité du bourgeon de la cellule-fille. Parmi ceux-ci, l'ARNm *ASH1* est le mieux caractérisé et constitue le modèle utilisé dans cette étude. Pour exercer sa fonction, la protéine Ash1 doit être produite uniquement après la localisation de l'ARNm *ASH1*. Pour ce faire, les mécanismes de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* empêchent son expression durant le transport.

Ce projet de recherche vise à étudier les mécanismes de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* par les répresseurs traductionnels connus, soit Khd1, Puf6 et Loc1. Les études antérieures se sont penchées sur ces facteurs de manière individuelle. Cependant, dans cette étude, nous avons exploré la présence d'une collaboration entre ceux-ci. Ainsi, nous avons voulu déterminer si les répresseurs traductionnels peuvent être intégrés en une seule voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. De plus, nous avons cherché à identifier le mécanisme de recrutement des répresseurs traductionnels sur l'ARNm *ASH1*, qui correspond au point initial des voies de régulations de l'ARNm *ASH1*.

Nos résultats montrent que les répresseurs traductionnels de l'ARNm *ASH1*, soit Khd1 et Puf6, font partie d'une même voie de régulation de la traduction. Le rôle du facteur

nucléaire Loc1 dans la voie de régulation de la traduction, quant à elle, a été examinée à partir d'expériences permettant l'étude du mécanisme de recrutement des répresseurs traductionnels dans le noyau. Ainsi, nos travaux montrent que Puf6 et Loc1 sont associés de manière ARN-dépendant avec la machinerie de transcription, notamment au facteur d'élongation de la transcription Spt4-Spt5/DSIF. Par ailleurs, notre laboratoire a précédemment montré que la localisation nucléaire de la protéine de liaison à l'ARN She2 est essentielle au recrutement des facteurs Loc1 et Puf6 sur l'ARNm *ASH1*. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) supportent l'hypothèse que le recrutement de Loc1 est essentiel à celui de Puf6, qui s'effectue ultérieurement. Ainsi, à partir des résultats de cette étude et des résultats publiés précédemment dans notre laboratoire, nous avons élaboré un modèle de recrutement coordonné des facteurs She2, Loc1 et Puf6 sur l'ARNm *ASH1* naissant. De manière générale, cette étude a permis d'établir la présence d'une seule voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* et une meilleure connaissance du recrutement des facteurs de répression traductionnelle sur celui-ci.

Mots-clés : localisation d'ARNm dirigé, ARNm *ASH1*, levure *Saccharomyces cerevisiae*, division cellulaire asymétrique, mécanismes de régulation de la traduction, voie de régulation de la traduction, répresseurs traductionnels, Khd1, Puf6, Loc1, She2, Spt4-Spt5/DSIF, essais luciférase, co-Immunoprécipitation (co-IP), immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), recrutement des facteurs de répression traductionnelle sur *ASH1*.

Abstract

Directed transport mRNA localization play a role in the development, the cell motility, the synaptic plasticity and asymmetric cellular division. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this regulation mechanism is conserved among many other species. During yeast cell division, around thirty mRNA are actively localized at the bud tip in the daughter cell. *ASH1* mRNA is the best known among them and constitutes the model used in this study. In this model, Ash1 expression is possible only after proper localization of its mRNA. In order to do so, *ASH1* mRNA translation is repressed by translational repressors during its active transport.

This project investigates the mechanism of *ASH1* mRNA translational regulation that is carried out by the translational repressors Khd1, Puf6 and Loc1. Previous studies characterized the action of these factors individually. However, in this study, we now explored the possibility of a collaboration between them. Thus, we sought to determine if these translational repressors are part of the same *ASH1* mRNA translational regulation pathway. In addition, we tried to identify the mechanisms of recruitment of these translational repressors on *ASH1* mRNA, the molecular mechanisms that initiates this process.

In this work, we show that the cytoplasmic translational repressors Khd1 and Puf6 are part of the same *ASH1* mRNA translational regulation pathway. In this pathway, the role of the nuclear translational factor Loc1 was determined by the analysis of translational factors recruitment on *ASH1* in the nucleus. We demonstrate that Puf6 and Loc1 interact in an RNA-dependent manner with the transcription machinery, via the transcription elongation factor

Spt4-Spt5/DSIF. Finally, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays support the model that Loc1 recruitment to nascent *ASH1* mRNA is essential for the subsequent recruitment of Puf6 to this transcript. With the results of this study and others previously done in the lab, we elaborated a recruitment model for the She2, Loc1 and Puf6 proteins on the nascent *ASH1* mRNA. In conclusion, this study has established that the translational repressors Khd1, Puf6 and Loc1 are part of the same *ASH1* mRNA translational regulation pathway and allowed a better understanding of the mechanism of recruitment of translational repressors on their target mRNA.

Keywords : mRNA localization, *ASH1* mRNA, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, asymmetric cellular division, translational regulation mechanism, translation regulation pathway, translational repressors, Khd1, Puf6, Loc1, She2, Spt4-Spt5/DSIF, luciferase assay, co-Immunoprecipitation (co-IP), chromatin immunoprecipitation (ChIP), translational factors recruitment on *ASH1*.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Code des acides aminés.....	xv
Code des acides nucléiques.....	xvi
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
1.1. La localisation des ARNm	2
1.1.1. La localisation d'ARNm par transport dirigé	5
1.1.2. Les différents rôles de la localisation d'ARNm par transport dirigé	8
1.2. La levure <i>S. cerevisiæ</i>, un modèle en biologie moléculaire	11
1.3. Les fonctions de la localisation de la protéine Ash1 chez la levure <i>S. cerevisiæ</i>	16
1.4. La régulation du transport de l'ARNm <i>ASH1</i> favorise la localisation de la protéine Ash1	20
1.4.1. Les éléments de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	20
1.4.2. Les gènes <i>SHE</i> sont responsables de la localisation des ARNm au bourgeon des levures.....	23
1.4.3. La protéine She2 est déterminante pour la localisation des ARNm au bourgeon	25
1.5. La régulation de la transcription de l'ARNm <i>ASH1</i> favorise la localisation de la protéine Ash1	27
1.5.1. Le complexe Spt4-Spt5 est une plateforme pour She2 impliquée dans la localisation de l'ARN <i>ASH1</i> et Ash1	28
1.6. La régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i> favorise la localisation de la protéine Ash1	31

1.6.1. Les répresseurs traductionnels de l'ARNm <i>ASH1</i>	35
1.6.1.1. Khd1.....	37
1.6.1.2. Puf6	40
1.6.1.3. Loc1.....	43
1.7. Mise en contexte	46
1.8. Hypothèse	49
Matériels et Méthodes	50
2.1. Culture cellulaire.....	51
2.2. Construction des souches	51
2.3. Construction de plasmides.....	54
2.4. Essais génétiques	55
2.5. Essais Luciférase.....	55
2.6. Co-Immunoprécipitation (co-IP)	55
2.6.1. Immunoprécipitation (IP)	56
2.6.2. Électrophorèse en gel SDS-PAGE.....	56
2.6.3. Immunobuvardage (IB).....	57
2.7. Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP)	58
Résultats expérimentaux	59
3.1. Identification des voies de régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>.....	60
3.1.1. Les essais génétiques ne démontrent aucun effet additif de Khd1 et Puf6 sur la régulation de <i>ASH1</i>	60
3.1.2. Les essais luciférase suggèrent l'existence d'une seule voie de régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	68
3.2. Recrutement co-transcriptionnel des facteurs de régulations de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	73
3.2.1. Les expériences de co-IP confirment l'interaction entre la machinerie de transcription et Puf6 ainsi que Loc1.....	73
3.2.2. Des expériences de ChIP démontrent un recrutement coordonné de Puf6 et de Loc1 directement sur la séquence <i>ASH1</i>	85
Discussion.....	91
4.1. Identification d'une voie commune de régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	94

4.1.1 Puf6 stimule le rôle de répression traductionnel de Khd1	96
4.1.2 Effet négligeable des phénotypes de régulation traductionnelle d'Ash1 à partir d'essais génétiques basée sur sa distribution asymétrique.....	97
4.1.3 Perspectives concernant la régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i> dans le cytoplasme	99
4.2. Initiation de la voie de régulation de la traduction commence par le recrutement coordonné des facteurs de répression traductionnelle sur l'ARNm <i>ASH1</i> durant sa synthèse.....	100
4.2.1 Perspectives concernant le recrutement des facteurs de régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i> dans le noyau.....	103
Conclusion	106
Bibliographie.....	107
Annexes	i
Annexe 1 : Article publié dans le journal <i>Transcription (2011), 2(2), p.86-90.....</i>	<i>ii</i>
Annexe 2 : Article publié dans le journal <i>Nucleic Acids Research</i> , en ligne, le 20 juin 2014.	<i>xix</i>
Annexe 3 : Plan de construction du plasmide p415-ADH1-RLUC	<i>lxxiii</i>

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des ARNm localisés au bourgeon chez la levure *S. cerevisiae*.

Tableau 2 Génotypes des souches *S. cerevisiae*. utilisées pour cette étude

Liste des figures

- Figure 1. La localisation d'ARNm par transport dirigé
- Figure 2. La localisation de l'ARNm *ASH1* permet la DCA chez la levure *S. cerevisiae*.
- Figure 3. La localisation de divers transcrits chez la levure *S. cerevisiae*.
- Figure 4. Le changement de type sexuel chez la levure *S. cerevisiae*.
- Figure 5. Les éléments de localisations de l'ARNm *ASH1*.
- Figure 6. Les protéines She1/Myo4, She2 et She3 forment le locosome.
- Figure 7. L'hétérodimère Spt4-Spt5 permet le recrutement co-transcriptionnel de She2 sur les éléments de localisation ou « zipcode » des ARNm en synthèse.
- Figure 8. L'initiation de la traduction chez les eucaryotes.
- Figure 9. La repression de la traduction de l'ARNm *ASH1* durant le transport permet la DCA.
- Figure 10. Modèle détaillé des mécanismes de régulation de la localisation de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1.
- Figure 11. Description des essais de génétiques inverses basés sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1.
- Figure 12. Essais génétiques basés sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1.
- Figure 13. Réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase de la luciole.
- Figure 14. Schéma des plasmides utilisés pour les essais luciférases.
- Figure 15. L'activité relative des protéines de fusion luciférases par rapport à la souche sauvage (WT) est observée dans les souches *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1*
- Figure 16. Description de la technique de co-Immunoprécipitation (co-IP).
- Figure 17. Co-IP entre Puf6-TAP et la sous-unité 1 de l'ARN polymérase II, Rpb1.
- Figure 18. Co-IP entre Puf6-myc et la sous-unité 1 de l'ARN polymérase II, Rpb1.
- Figure 19. Co-IP inverse entre Puf6-myc et la sous-unité 1 de l'ARN polymérase II, Rpb1.
- Figure 20. Co-IP entre le dimère de régulation de la transcription Spt4-TAP/Spt5-TAP et Puf6-myc.
- Figure 21. Co-IP entre le dimère de régulation de la transcription Spt4-TAP/Spt5-TAP et Loc1-myc.
- Figure 22. Description de la technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP).

Figure 23. Recrutement coordonné des facteurs de traduction Loc1-TAP et Puf6-TAP sur le gène *ASH1*

Liste des abréviations

°C	degré Celsius
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	concentration micromolaire
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
<i>ASH</i>	Asymmetric Synthesis of Ho
ATP	Adénosine triphosphate
AUG	codon initiateur
BSA	Bovine Serum Albumine
CAN	Canavanine
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine
Ck	caséine kinase
Cl	Chlore
<i>CLN</i>	cycline
co-IP	co-Immunoprécipitation
C-terminal	carboxy-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCA	division cellulaire asymétrique
DO	densité optique
DSIF	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole Sensitivity Inducing Factor
E1-3	Élément de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	engendre une chemiluminescence

EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
eIF	facteurs d'initiation de la traduction chez les eucaryotes
et al.	et alii (latin, "et les autres")
FISH	hybridation de fluorescence <i>in situ</i>
<i>FLO</i>	Flocculation
<i>FLUC</i>	gène rapporteur de la luciférase de la luciole
FUN	Function Unknown Now
G1	Gap1
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	proteine fluorescente verte
GST	glutathione S-transférase
GTFs	facteurs généraux de la transcription
GTP	Guanosine triphosphate
H	Hydrogène
HDAC	complexe deacetylase d'histones
<i>HO</i>	Homothallic switching
hnRNP K	heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K
HRP	horseradish peroxydase
IB	immunobuvardage
IgG	Immunoglobulin G
IP	immunoprécipitation
<i>KAN</i>	gène de résistance à la Kanamycine
kDa	Kilodalton
Khdl	protéine KH-domain 1
L	Litre
Loc1	Localization of <i>ASH1</i> mRNA
LUC	Luciferase
M	concentration molaire
m ⁷ G	7-méthylguanosine
Mg	Magnésium

min	minute
mM	concentration millimolaire
ml	mililitre
<i>MYO</i>	myosine
Na	Sodium
nm	nanomètre
NLS	séquence de localisation nucléaire
N-terminal	amino-terminal
O	Oxygène
Pab	Poly(A) binding protein
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentiel hydrogène
PIC	complexe de préinitiation
Pol II	ARN polymérase II
PPi	pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$)
PUF	Pumilio-homology domain Family
qPCR	Real-time PCR
RE	reticulum endoplasmique
RNase	enzymes de digestion de l'ARN
RNP	ribonucléoprotéique
Rpb	RNA Polymerase subunit
S	Svedberg unit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SCP</i>	<i>S. cerevisiae</i> protein involved in the Control of Ploidy
SDS	Sodium dodecyl sulfate
she	swi5p HO-dependent Expression
spt	SuPpressor of Ty's
Srp1	Suppressor of rpb1

Swi5	SWItching deficient
TAP	tandem affinity purification
TEV	virus de la gravure du tabac
TIF	Translation Initiation Factor
TRP1	Tryptophan requiring
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
Ty1	rétransposon
ts	thermosensible
URS	Upstream Repression Sequence
UTR	untranslated region
WT	wild type (type sauvage en français)
Yck	yeast casein kinase
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
Zbp	zipcode-binding protein

Code des acides aminées

Symbole	Abréviations	Description
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
O	Pyl	Pyrrolysine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
U	Sec	Sélénocystéine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Code des acides nucléiques

Symbole	Abréviations	Description
A	ADE	Adénine
C	CYT	Cytosine
G	GUA	Guanine
T	THY	Thymine
U	URA	Uracile
R	-	puRine
Y	-	pYrimidine
N	-	aNy base (en anglais, toutes les bases)

Pour Simon Chabot,

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pascal Chartrand, Ph.D., pour son accueil et son implication dans la communauté scientifique, ce qui m'a permis de participer à divers congrès, conférences, publications et concours. En l'absence de ses nombreuses corrections, ainsi que celles d'Emmanuelle Querido, Ph.D., l'obtention de bourses et papiers n'aurait pas été possible. De plus, je tiens à remercier tous les autres membres du laboratoire pour leur appui moral et leurs conseils, plus personnellement; Nicolas Paquin, Ph.D., Frank Gallardo, Ph.D., Anne-Laure Finoux, Ph.D., Émilio Cusanelli, Ph.D., Anick St-Denis, M.Sc., Catherine Ménard, M.Sc., Carmina Angelica Perez Romero, M. Sc., Thomas Vergnaud ainsi que, tout particulièrement, Zhi Fa Shen, Ph.D. et Karen Shahbavian, Ph.D, qui ont intégré mes résultats dans certaines de leurs publications.

Ne pouvant ignorer que tout ce soutien n'aurait pas été nécessairement suffisant pour que ce manuscrit prenne forme, je souhaite ardemment remercier Muriel Aubry, Ph.D et Marie-Ève Fortier, Ph.D. Muriel Aubry pour son encouragement dans l'élaboration de mon plan de rédaction qui fût l'ancrage de départ. Marie-Ève Fortier, par ses rencontres sur une base régulière durant la rédaction de ce mémoire, son tutorat et ses multiples corrections, a définitivement favorisé mon épanouissement dans ce processus d'écriture.

Fréquemment, durant mes études graduées, j'ai eu un sentiment d'appartenance auprès du département de biochimie qui m'a fait grand bien. Pour cela, je tiens à exprimer ma reconnaissance auprès de tous les membres du personnel et étudiants des autres laboratoires que j'ai connu. De plus, j'aimerais souligner le soutien moral et technique de certains d'entre eux, tel que: Vincent Messier, Ph.D., Mohan Malleshaiah, Ph.D., PoHien Ear, Ph.D., Durga Sivanesan, Ph.D., Xavier Deschênes-Simard, Ph.D., Xavier Mascle, Ph.D., Camille Malouf, Ph.D., Alexandre Desjardins, Ph.D., Éric Bonneau, Patricia Bouchard, M.Sc., Étienne Lepage, Jean-Sébastien Parent, Ph.D., Mathieu Coincon, Ph.D., Philippe Lampron, M.Sc, Jean-François Paradis et Sylvie Beauchemin.

Il est indispensable, pour terminer mes remerciements, que je fasse part de ma gratitude à ceux qui seront toujours là pour moi, ma famille/belle-famille et mes proches. Je tiens à leur dire merci de tout mon coeur pour les mots chaleureux et les encouragements constants. Sans eux, l'obtention de ce diplôme n'aurait pas eu de sens.

Ne voulant ignorer personne, je tiens à vous remercier, chers lecteurs, et j'espère que ce mémoire sera à votre convenance.

Introduction

1.1. La localisation des ARNm

Les cellules possèdent une variété d'organelles, de compartiments et de membranes qui permettent le regroupement de facteurs spécifiques. La composition et l'activité localisée de ces regroupements sont nécessaires pour la régulation de plusieurs fonctions biologiques. En 1975, il a été découvert que la localisation des protéines membranaires est effectuée grâce au peptide signal des facteurs localisés (Blobel & Dobberstein, 1975). Les études semblaient suggérer que la distribution des protéines dans les diverses régions cellulaires se produit principalement après la traduction de celles-ci, via l'exposition d'un peptide signal nécessaire à leur localisation. Toutefois, plusieurs chercheurs ont démontré que la localisation des protéines peut avoir lieu avant leur traduction, par l'intermédiaire de la localisation de leur ARNm (Bashirullah et al., 1998; Czaplinski & Singer, 2006; Kloc et al., 2002; St Johnston, 2005). La localisation de l'ARNm est un mécanisme de régulation spatiotemporel de protéines spécifiques, c'est-à-dire qu'il permet de déterminer l'endroit et le moment de leur expression dans les cellules.

Les nouvelles technologies ont permis à l'équipe de recherche d'Henry Krause d'évaluer l'étendue véritable du phénomène de localisation des ARNm, qui fût longtemps considéré comme secondaire (Lécuyer et al., 2007). La visualisation à grande échelle de 3370 transcrits dans les embryons de drosophiles en phase précoce de développement, correspondant à une cellule multinucléée, a été obtenue par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) à haute résolution. Les auteurs ont conclu que la localisation des ARNm constitue un mécanisme majeur de contrôle de l'architecture et des fonctions cellulaires, puisque 71% des

transcrits observés sont localisés (Lécuyer et al., 2007). Ainsi, une douzaine de localisations inattendues d'ARNm ont été observées, et les auteurs supposent un nombre équivalent de nouveaux mécanismes impliqués dans la localisation cellulaire. Néanmoins, une combinaison de mécanismes est souvent nécessaire pour permettre la localisation d'ARNm (Holt & Bullock, 2009). De plus, trois mécanismes principaux sont considérés comme la base de la localisation des ARNm : la dégradation sélective des ARNm, la diffusion couplée à une capture locale des ARNm et le transport dirigé des ARNm sur le cytosquelette de la cellule (Medioni et al., 2012).

La localisation d'ARNm par dégradation sélective s'effectue par l'assemblage du complexe de dégradation sur les ARNm non localisés pour permettre la seule accumulation des ARNm localisés dans la cellule, par exemple l'ARNm *Hsp83* chez la drosophile (Ding et al., 1993; Semotok et al., 2005). Toutefois, le mécanisme de protection locale de ces transcrits spécifiques demeure encore inconnu (Holt & Bullock, 2009; Medioni et al., 2012). La localisation d'ARNm par diffusion s'effectue à la suite de la capture locale des ARNm localisés qui diffusent librement dans la cellule, tel que l'ARNm *Nanos* chez la drosophile ainsi que les ARNm *Xcat2* et *Xdaz1* chez le xenopus (Chang et al., 2004; Forrest & Gavis, 2003). Ces ARNm sont transcrits localement suite à leur ancrage, dont le mécanisme est indépendant du mécanisme de diffusion qui permet leur déplacement (Medioni et al., 2012). Par ailleurs, la localisation d'ARNm par transport dirigé consiste à cibler les ARNm localisés directement par la reconnaissance de plusieurs facteurs nucléaires et cytoplasmiques nécessaires à la localisation de l'ARNm et ainsi former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) (**Figure 1**). L'ARNm reconnu est alors transporté sur les filaments appropriés du cytosquelette de la cellule, en fonction des protéines motrices contenues dans le complexe

RNP. Lorsqu'il est arrivé à destination, le mécanisme d'ancrage permet l'activation de l'expression de l'ARNm ainsi localisé. En effet, la traduction est réprimée jusqu'au moment où le transcrit a atteint sa destination pour éviter l'expression de protéines dans des endroits inappropriés. Ainsi, la localisation d'ARNm par transport dirigé implique la reconnaissance des ARNm ciblés par divers facteurs qui vont permettre: la reconnaissance des ARNm localisés dans le noyau, le transport sur les filaments du cytosquelette, l'inhibition de la traduction durant le transport ainsi que l'activation de la traduction au site de localisation (Besse & Ephrussi, 2008; Bullock, 2011; Holt & Bullock, 2009; Martin & Ephrussi, 2009).

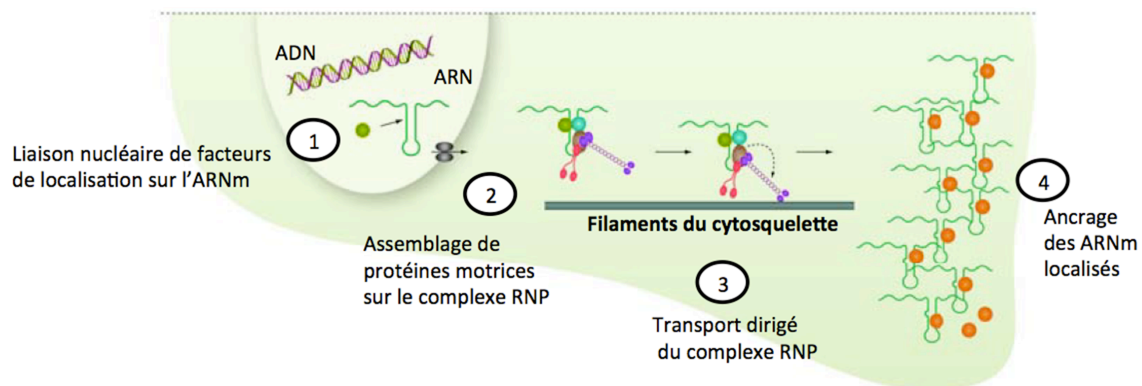


Figure 1. Localisation d'ARNm par transport dirigé. Les ARNm sont reconnus dans le noyau par des facteurs nécessaires à la localisation de l'ARNm (1). Dans le cytoplasme, de nouveaux facteurs de localisation, comprenant les protéines motrices, s'ajoutent (2) et permettent le déplacement du complexe RNP sur les filaments du cytosquelette (3). Lorsqu'ils sont arrivés à destination, la localisation des ARNm est complétée par leur ancrage (4). Schéma adapté de la source: (Holt & Bullock, 2009)

1.1.1. La localisation d'ARNm par transport dirigé

Le mécanisme moléculaire prédominant pour la localisation des ARNm dans une variété de types de cellules est la localisation d'ARNm par transport actif, puisqu'il permet rapidement la translocation de larges complexes RNP sur de longues distances cellulaires (Bullock, 2011; Holt & Bullock, 2009). Ce mécanisme fut suggéré à la suite d'observations de plusieurs ARNm localisés qui se retrouvent dispersés lors de l'utilisation de drogues entraînant la dépolymérisation des microtubules ou des filaments d'actines (Long et al., 1997; St Johnston, 1995; Sundell & Singer, 1991). Les transcrits localisés observés, qu'ils soient injectés ou exprimés *in vivo*, forment de larges particules et granules correspondant à des complexes RNP (Ainger et al., 1993; Bertrand et al., 1998; Ferrandon et al., 1994). Le nombre de molécules d'ARNm et de protéines contenu dans un seul complexe RNP est inconnu et variable (Medioni et al., 2012). En effet, les analyses protéomiques des complexes RNP révèlent qu'un grand nombre de protéines y sont associées (Kanai et al., 2004). Certaines de ces protéines sont recrutées sur l'ARNm dans le noyau, durant sa transcription ou son épissage, pour permettre le recrutement ultérieur de la machinerie de transport dans le cytoplasme (Marchand et al., 2012).

Les protéines nécessaires à leur localisation s'associent aux ARNm cibles par la reconnaissance, directe ou indirecte, de leurs éléments de localisation ou « zipcodes » (Bashirullah et al., 1998). Ces éléments de localisation sont normalement situés dans la partie 3' non codante (3'UTR) des ARNm localisés. Néanmoins, certains ARNm localisés possèdent aussi des éléments de localisation sur leur 5'UTR et leur séquence codante, tel que l'ARNm *ASH1* chez la levure et les ARNm *Gurken* et *Bitesize* chez la drosophile (Chartrand

et al., 1999; Gonzalez et al., 1999; Serano & Rubin, 2003; Thio et al., 2000). Ainsi, les séquences et le nombre d'éléments de localisation sont variables sur chaque ARNm localisé, selon les facteurs recrutés nécessaires à leur localisation (Holt & Bullock, 2009). De plus, la structure secondaire de ces éléments varie et peut prendre la forme de simple brin ou de tige-boucle double brins (Jambhekar & Derisi, 2007). La structure tertiaire des « zipcodes » est aussi déterminante pour la reconnaissance de ces éléments en *cis* par les facteurs de localisation en *trans*. En effet, des études récentes démontrent la nécessité de certains motifs ou structures spécifiques plus complexes et tridimensionnelles pour le recrutement de ces facteurs. Par exemple, la protéine Zbp1 s'associe simultanément à deux motifs de liaison de l'ARNm β -actine, qui représentent un élément de localisation binaire (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012). Tandis que chez la drosophile, la protéine Egalitarian reconnaît une structure tridimensionnelle atypique en hélice A' chez plusieurs ARNm localisés ayant peu en commun au niveau de la séquence primaire de leurs « zipcodes » (Bullock et al., 2010). Ainsi, il s'avère difficile de déterminer une signature des éléments des ARNm localisés malgré les recherches qui procurent une large banque de données de séquences primaires et la découverte de plusieurs nouveaux éléments de localisation potentiels des ARNm localisés (Medioni et al., 2012).

Les divers facteurs associés aux ARNm localisés dans le noyau sont remodelés suite à l'export des ARNm pour permettre l'association des protéines motrices sur le complexe RNP (Medioni et al., 2012). En effet, pour migrer le long du cytosquelette de la cellule, les ARNm localisés par ce mécanisme sont transportés grâce à diverses protéines motrices recrutées sur les complexes RNP dans le cytoplasme. Les types de protéines motrices sont les myosines, qui se déplacent le long des filaments d'actine, ainsi que les kinésines et les dynéines, qui se

meuvent le long des microtubules. Les avancées techniques en imagerie cellulaire en temps réel des dernières années, impliquant la détection de protéines fluorescentes motrices sur différents ARNm fluorescents, présentent de nombreux exemples où les transcrits localisés recrutent et parfois modulent un grand nombre de protéines motrices (Holt & Bullock, 2009). La nature et le nombre de protéines motrices actives recrutées sur les complexes RNP déterminent leur vitesse de procession, l'utilisation des filaments d'actines ou des microtubules et leur manière de se déplacer (uni ou bidirectionnelle) (Bullock, 2011; Gagnon & Mowry, 2011; Marchand et al., 2012).

La production locale des protéines est déclenchée après le transport, lorsque l'ARNm localisé est arrivé à destination. Les mécanismes d'ancrage qui permettent l'activation de la traduction sont peu connus. Néanmoins, un mode de fonctionnement est redondant dans tous les systèmes où la localisation dirigée d'ARNm a été étudiée, soit la phosphorylation des répresseurs traductionnels contenus dans les complexes RNP. En effet, lorsque les ARNm cibles sont localisés, un signal, soit en réponse à un stimulus ou à l'arrivée des complexes RNP, permet la phosphorylation des facteurs de répression, ce qui réduit leur affinité avec les ARNm localisés et entraîne l'activation de leur traduction locale. (Medioni et al., 2012)

Les répresseurs traductionnels font partie des facteurs qui s'associent aux éléments de localisation des ARNm et ainsi bloquent la traduction principalement en empêchant le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction (Besse & Ephrussi, 2008). En l'absence de ces facteurs de répression traductionnelle, les ARNm localisés sont traduits durant leur transport et les protéines produites, qui sont normalement exprimées exclusivement localement, se retrouvent alors à des endroits où elles ne sont pas destinées. Ainsi, la

délocalisation des protéines cibles ne permet pas l'accomplissement de leurs rôles.

1.1.2. Les différents rôles de la localisation d'ARNm par transport dirigé

La localisation d'ARNm par transport dirigé permet l'expression d'une grande quantité de protéines localement avec un faible coût énergétique (Jansen, 2001). En effet, la cellule peut produire plusieurs protéines à l'endroit désigné à partir d'un seul transcrit, alors qu'elle devrait fournir une plus grande quantité d'énergie pour localiser individuellement chaque protéine. La localisation d'ARNm est un phénomène impliqué dans divers processus biologiques essentiels chez plusieurs organismes, tels que la motilité cellulaire, la plasticité synaptique, le développement et la division cellulaire asymétrique (St Johnston, 2005).

Suite à la localisation d'un ARNm, la traduction du transcrit permet une concentration plus élevée de la protéine à un endroit cellulaire précis. Cela favorise une réponse biologique locale et rapide, tel que pour l'ARNm β -actine qui est localisée par transport dirigé. Ainsi, la concentration locale de protéine β -actine chez les fibroblastes entraîne le déplacement de la cellule en favorisant la motilité cellulaire dans la direction où la β -actine est la plus concentrée (Dahm & Kiebler, 2005). Lorsqu'exprimée dans les neurones, la densité élevée locale de protéines β -actine est impliquée dans la plasticité synaptique et l'excroissance des neurites (Zhang et al., 2001).

Durant le développement, la localisation d'ARNm permet l'établissement de gradients de morphogènes dans les œufs ou les ovocytes de plusieurs organismes, tels que la *drosophile*, le *xenopus*, le poisson zébré, la méduse *Clytia* et l'ascidie (Medioni et al., 2012). En effet, les ARNm maternels localisés déterminent des motifs d'expression de gène qui définissent

plusieurs axes embryonnaires et destin cellulaire durant le développement (Kumano, 2012). L'exemple le mieux connu est l'ARNm *oskar*, qui est localisé par transport dirigé au pôle postérieur de l'ovocyte de la *drosophile* (Rongo et al., 1995). L'expression localisée de la protéine Oskar détermine l'endroit où l'abdomen se développe ainsi que le lieu de formation des cellules germinales de l'embryon. De plus, la polarisation de la protéine Oskar favorise la localisation d'autres ARNm qui sont essentiels au développement, tels que l'ARNm *nanos*. La ségrégation de la protéine Nanos est impliquée dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur et la formation de l'abdomen de la *drosophile* (Bergsten et al., 2001).

Finalement, la localisation d'ARNm est impliquée dans la division cellulaire asymétrique (DCA). La DCA est définie par une cellule mère qui engendre une cellule fille ayant des propriétés qui divergent d'elle-même, contrairement à une division cellulaire symétrique où la cellule fille engendrée possède des caractéristiques identiques. La DCA est largement étudiée dans le contexte du développement embryonnaire et de la biologie des cellules souches chez les mammifères (Inaba & Yamashita, 2012). La localisation d'ARNm peut permettre la DCA en favorisant l'isolement de transcrits dans une seule cellule impliquée dans une division cellulaire. La DCA et la localisation d'ARNm sont des mécanismes conservés chez plusieurs organismes tels que les mammifères et les plantes, mais aussi chez les eucaryotes (Xing & Bassell, 2013). En effet, certaines bactéries et levures se divisent de manière asymétrique telles que la bactérie *Caulobacter crescentus* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Inaba & Yamashita, 2012). D'ailleurs, un modèle largement étudié de ce type de localisation de l'ARNm est la localisation de l'ARNm *ASH1* chez la levure *S. cerevisiae* (Long et al., 1997).

Le terme Ash1 provient de l'«Asymmetric Synthesis of Ho», c'est-à-dire la synthèse asymétrique de la protéine Ho (Bobola et al., 1996). À la suite de la cytokinèse, seule la cellule fille contient le facteur Ash1 dont la fonction la plus connue est la répression transcriptionnelle du gène codant pour l'endonucléase Ho. L'inhibition de la transcription du gène codant pour l'endonucléase Ho par Ash1 prévient le changement de type sexuel chez la levure *S. cerevisiae* (Bobola et al., 1996). Pour ce faire, la localisation de l'ARNm *ASH1* s'effectue par transport dirigé jusqu'au bourgeon de la cellule-fille, où la protéine Ash1 est exprimée durant l'anaphase, à la fin de la division cellulaire (**Figure 2**).

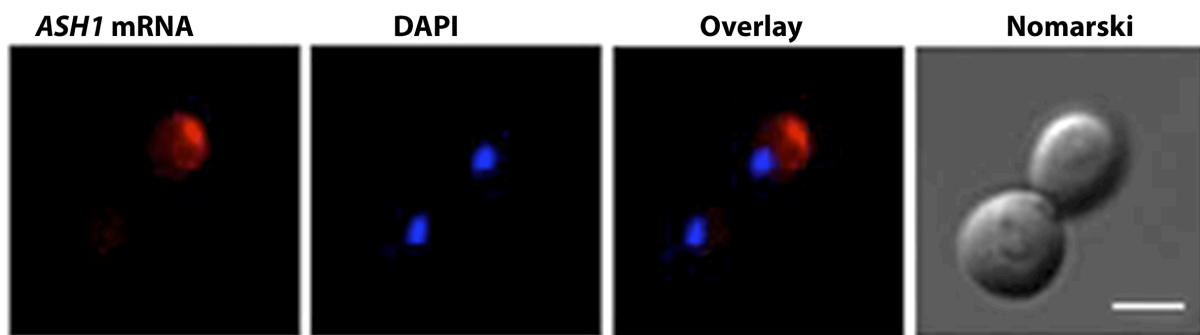


Figure 2. La localisation de l'ARNm *ASH1* permet la DCA chez la levure *S. cerevisiae*. L'ARNm *ASH1* est visualisé avec des sondes fluorescentes spécifiques (en rouge) à l'aide de la technique d'hybridation de fluorescence *in situ* (FISH), tandis que les noyaux de la levure en bourgeonnement sont représentés (en bleu) par le marquage DAPI de l'ADN. Les levures proviennent de souches sauvages en fin d'anaphase, tel que perçu par contraste Nomarski. Dans 91,2% des levures, le transcrite *ASH1* est localisé au bourgeon de la cellule-fille où a lieu son expression. La protéine Ash1 est exprimée seulement dans les cellules-filles, qui se distinguent alors des cellules-mères et ainsi représentent le phénomène de division cellulaire asymétrique (DCA). Source : (Shen et al., 2009)

1.2. La levure *S. cerevisiae*, un modèle en biologie moléculaire

La levure *S. cerevisiae* est la variété de levures la plus connue parmi les quelque 700 espèces de levures répertoriées. Sa popularité provient de l'usage domestique de cette levure, notamment pour la fabrication du pain et de certaines boissons alcoolisées. Déjà utilisée 6000 ans av. J.-C. par les Sumériens et les Babyloniens, la levure *S. cerevisiae* est probablement le plus vieux microorganisme domestiqué. Son nom latin provient de son observation dans une culture de malt en 1837, et sa capacité de fermentation du sucre fût analysée en 1857 dans les premières expériences de Louis Pasteur intitulées « Études sur la bière » (Krebs, 1972).

Suite aux travaux de Pasteur, il faudra attendre encore environ 100 ans pour que la levure *S. cerevisiae* reçoive autant d'intérêt dans les laboratoires scientifiques que dans les cuisines et l'industrie agroalimentaire (Roman). Pourtant, la rapidité de croissance et les manipulations sans risque des levures constituent des avantages techniques indéniables. En effet, le temps de génération de quelques heures de la levure est comparable à celui des bactéries *Escherichia coli*, mais contrairement à celle-ci, les levures sont des organismes eucaryotes et non pathogènes.

Néanmoins, l'introduction de la levure *S. cerevisiae* comme modèle de recherche a été favorisée par les connaissances plus approfondies de la biologie des levures ainsi que par l'établissement de la première carte génétique de l'espèce (Lindgren, 1945). De plus, la découverte de techniques de transformation par recombinaison d'ADN pour produire notamment des expériences de génétique inverse a contribué à une forte croissance de l'intérêt de la communauté scientifique pour la levure comme modèle expérimental en biologie

moléculaire (Botstein & Fink, 1988; Strathern et al., 1981). La malléabilité génétique de cet organisme unicellulaire a aussi permis d'établir facilement la relation entre les divers gènes structuraux et la fonction des protéines associées, et ce, auprès de plusieurs autres eucaryotes (Botstein & Fink, 1988). En effet, les voies métaboliques et les mécanismes biochimiques de la levure *S. cerevisiae* sont généralement conservés chez les métazoaires. D'ailleurs, de nombreuses protéines chez la levure sont connues et répertoriées comme étant homologues à d'autres organismes (Botstein & Fink, 2011). Ainsi, il n'est pas surprenant qu'en 1996, après six années de recherche, la levure *S. cerevisiae* fut le premier organisme eucaryote dont le génome a été complètement séquencé, ce qui en a fait un outil expérimental de premier plan en recherche biomoléculaire (Goffeau et al., 1996) (Dujon, 1996).

Par ailleurs, la localisation des ARNm est un phénomène répandu chez la levure *S. cerevisiae*. La levure s'est révélée être un excellent organisme modèle pour étudier les mécanismes moléculaire impliqués dans le transport des ARNm (Darzacq et al., 2003; Heym & Niessing, 2011; Muller et al., 2006; Paquin & Chartrand, 2008). Cet organisme unicellulaire contient approximativement 4000 gènes codants et au moins 30% de ces transcrits sont localisés à différentes locations dans la cellule. En effet, environ 500 transcrits sont ciblés à la surface de la mitochondrie, 700 transcrits sont dirigés au réticulum endoplasmique (RE) et plus d'une vingtaine d'ARNm sont localisés à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille (Parker, 2010) (**Figure 3**). Plus précisément, 28 ARNm sont localisés à la partie distale de la cellule fille en bourgeonnement (**Tableau 1**) (Aronov et al., 2007; Oeffinger et al., 2007; Shepard et al., 2003). Néanmoins, suite à la localisation au bourgeon de ces transcrits, plusieurs de ces protéines seront relocalisées dans divers organelles de la cellule fille tels que le noyau, le RE, la mitochondrie et la vacuole (Shepard et al., 2003).

Certains de ces transcrits et protéines sont ciblés au RE cortical afin de permettre la localisation de protéines à la membrane de la cellule fille (Aronov et al., 2007; Schmid et al., 2006; Takizawa et al., 2000). Ce transport intracellulaire à partir du RE cortical a été considéré comme une voie de transport de protéines ciblées à d'autres compartiments que la membrane, tel qu'Ash1, qui est relocalisée au noyau de la cellule fille (Aronov et al., 2007) (Paquin & Chartrand, 2008). Cependant, des études récentes ont démontré que le transport dirigé de l'ARNm *ASH1* est indépendant du RE cortical et est effectué spécifiquement sur les filaments d'actine (Fundakowski et al., 2012).

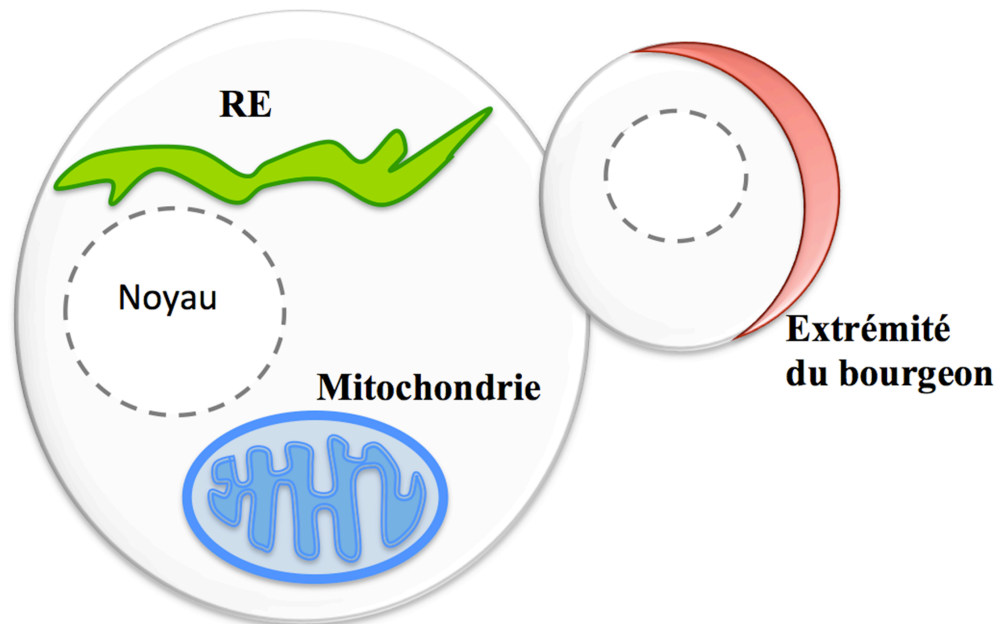


Figure 3. La localisation de divers transcrits chez la levure *S. cerevisiae*. Chez la levure *S. cerevisiae*, environ 30% des 4000 transcrits sont localisés, soit approximativement: 500 transcrits à la membrane de la mitochondrie, 700 transcrits à la membrane du reticulum endoplasmique (RE) et 30 transcrits à l'extrémité du bourgeon de la cellule-fille.

Schéma inspiré de la source : (Parker, 2010).

Tableau 1. Liste des ARNm localisés au bourgeon chez la levure *S. cerevisiae*.

Gènes codants	Fonctions de la protéines
<i>ASH1</i>	Régulation de la transcription
<i>BRO1</i>	Transduction des signaux de stress
<i>CDC42</i>	Organisation de la polarité cellulaire
<i>CLB2</i>	Cycline B
<i>CPS1</i>	Carboxypeptidase
<i>DNMI</i>	Fission mitochondriale
<i>EGT2</i>	Cellulase
<i>ERG2</i>	Isomérase de stérol
<i>EXO84</i>	Exocytose
<i>IST2</i>	Transporteur membranaire
<i>KSS1</i>	MAP kinase
<i>LCB1</i>	Synthèse des lipides
<i>MET4</i>	Coactivateur transcriptionnel
<i>MID2</i>	Récepteur membranaire
<i>MMR1</i>	Inconnue
<i>MTL1</i>	Inconnue
<i>RHO3</i>	Organisation de la polarité et de l'actine
<i>SEC1</i>	Exocytose
<i>SEC3</i>	Exocytose
<i>SEC4</i>	Exocytose
<i>SRL1</i>	Inconnue
<i>SRO7</i>	Exocytose
<i>SRO77</i>	Exocytose
<i>TPO1</i>	Transport des polyamines
<i>WSC2</i>	Récepteur membranaire
<i>EAR1</i>	Transport vésiculaire
<i>YPT1</i>	Transport vésiculaire

Adapté de : (Aronov et al., 2007; Shepard et al., 2003)

1.3. Les fonctions de la localisation de la protéine Ash1 chez la levure *S. cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est viable avec un génome haploïde ou diploïde et alterne entre ces deux formes (**Figure 4**). À l'état naturel, dans des conditions favorables, la levure possède deux copies de ses chromosomes, chacune d'entre elles contenant la séquence correspondant à un type sexuel. Ainsi, la levure ayant un génome diploïde contient les deux genres, soit **a** et **α**. Sous forme diploïde, la levure peut parfaitement se reproduire par mitose. Toutefois, pour se protéger des conditions défavorables, la levure a la capacité d'entrer en méiose et former des spores. Suite à la sporulation, chacun des quatre spores possède une seule copie des chromosomes contenant leur type sexuel respectif, soit **a** ou **α**. Dans la nature, les spores se retrouvent dans l'air et ainsi changent d'environnement. Arrivée sur un milieu plus adéquat, un spore redevient levure haploïde, mais elle se retrouve possiblement isolée. Néanmoins, le retour sous une forme diploïde est favorable pour la survie de la levure. Toutefois, cela implique la reproduction de deux cellules haploïdes de type sexuel opposé, soit **a** et **α**. Pour s'assurer de l'obtention des deux genres différents, la levure sous forme haploïde se divise de manière asymétrique, par le bourgeonnement d'une cellule fille à partir de la cellule mère. La cellule mère change toujours de type sexuel alors que la cellule fille conserve l'héritage de son type sexuel grâce à la présence d'Ash1 (Cosma, 2004) (Darzacq et al., 2003).

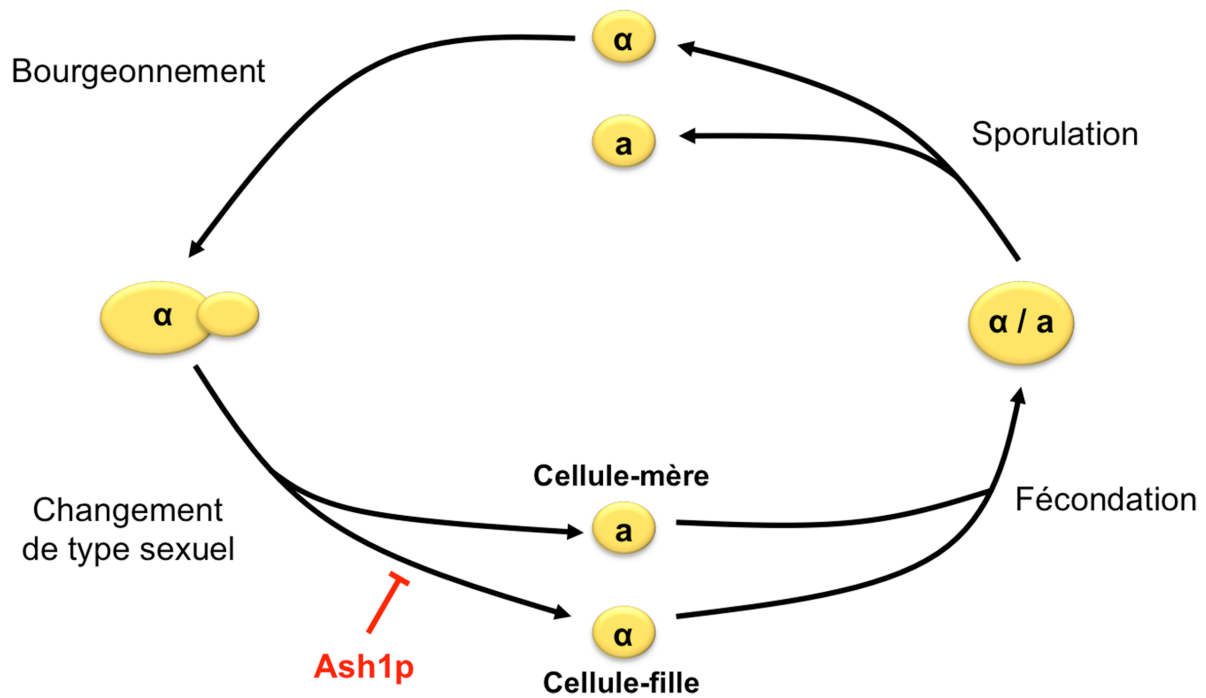


Figure 4. Le changement de type sexuel chez la levure *S. cerevisiae*. La levure haploïde possède un seul type sexuel, soit α (tel qu'illustré sur ce schéma) ou a , et elle se divise par bourgeonnement. Suite à la division cellulaire, la cellule-mère est soumise à un changement de type sexuel, tandis que la cellule-fille préserve le type sexuel d'origine. Pour ce faire, Ash1p est distribuée de manière asymétrique et relocalisée exclusivement dans la cellule-fille. Localisée dans le noyau de la cellule-fille, Ash1p inhibe l'expression génétique de l'endonucléase *HO*, qui favorise le changement de type sexuel. Cette DCA permet la production de levures haploïdes de type sexuel différent qui pourront, suite à leur fécondation, devenir diploïdes dans des conditions favorables. Dans des conditions défavorables, la levure diploïde α/a peut survivre par sporulation. La sporulation de la levure engendre 2 spores haploïdes qui seront dispersés et redeviendront levures haploïdes dans un milieu propice. Modifié de la source : (Paquin, 2008)

C'est la localisation de la protéine Ash1 dans le noyau de la cellule fille exclusivement qui prévient le changement de type sexuel de la cellule fille haploïde (Bobola et al., 1996; Sil & Herskowitz, 1996). Tout d'abord, le changement de type sexuel de la levure est effectué par l'endonucléase *Ho* qui catalyse le clivage spécifique de l'ADN dans le locus *MAT* de la

cellule mère (Haber, 1998). Ensuite, le clivage des brins d'ADN favorise la recombinaison homologue d'une ou l'autre des cassettes silencieuses flanquées de part et d'autre du locus MAT. En fonction de la cassette qui est remplacée et maintenant exprimée sur le gène MAT, le genre sexuel de la cellule mère est modifié du type **a** au type **α**, ou inversement (Maxon & Herskowitz, 2001).

Pour empêcher ce mécanisme d'action d'avoir lieu chez la cellule fille, la transcription du gène *HO* codant pour l'endonucléase responsable de ce changement de type sexuel est inhibée. La transcription du gène *HO* est initiée par la reconnaissance du facteur de transcription Swi5 avec l'élément du promoteur *HO* (URS1) (Breedon & Nasmyth, 1987; Nasmyth, 1993). Lorsqu'Ash1 est présent dans le noyau, celle-ci s'associe à un élément connexe du promoteur *HO* (URS2) et empêche la liaison de Swi5 sur son élément de liaison (Maxon & Herskowitz, 2001). L'expression génétique de la séquence *HO* est donc inhibée (Cosma et al., 1999) (Cosma, 2004). Ainsi, localisé dans le noyau de la cellule fille, le facteur Ash1 exerce la fonction de répresseur transcriptionnel sur le gène *HO* (Takizawa et al., 1997) (Long et al., 1997). De plus, il a été démontré que le facteur Ash1 contribue aussi à la réduction de la transcription du gène *CLN3*, qui permet l'entrée irréversible dans le cycle cellulaire en G1 (Di Talia et al., 2009). Les cellules filles récemment bourgeonnées étant plus petites, elles nécessitent une période de croissance cellulaire plus longue jusqu'à l'obtention d'une taille suffisante pour devenir cellules mères à leur tour et permettre leur reproduction (Di Talia et al., 2007). Ainsi, les gènes *HO* et *CLN3* sont tous deux réprimés par Ash1 chez la cellule fille exclusivement.

Pour mener à bien sa fonction de répresseur transcriptionnel, la protéine Ash1 est donc dépendante de sa localisation nucléaire chez la cellule fille spécifiquement. Toutefois, la localisation d'Ash1 nécessite la localisation du messenger *ASH1* ainsi que de sa traduction à la partie distale du bourgeon de la cellule à la fin de l'anaphase (Besse & Ephrussi, 2008; Muller et al., 2006; Paquin & Chartrand, 2008). Ainsi, la distribution asymétrique d'Ash1 cause la DCA des levures *S. cerevisiae* sous forme haploïde, ce qui permet à la cellule mère et à la cellule fille de se différencier pour favoriser la survie de leur espèce.

Étonnamment, auprès des levures *S. cerevisiae* qui n'ont pas besoin de changement de type sexuel pour mieux survivre, c'est-à-dire sous forme diploïde, la distribution asymétrique d'Ash1 est toujours conservée (Sil & Herskowitz, 1996). Cette dernière observation suppose d'autres fonctions pour le facteur Ash1. Par exemple, la présence d'Ash1 exclusivement dans le noyau des cellules filles est essentielle pour la croissance pseudohyphale, tant chez les levures haploïdes ou diploïdes (Chandarlapaty & Errede, 1998). La croissance de filaments chez les levures haploïdes se produit suite à une trop longue incubation sur un milieu agar riche. Ce changement de morphologie de la levure est une réponse à une forte réduction des nutriments et cela se traduit par l'apparition d'une croissance invasive et allongée (Roberts & Fink, 1994). Chez les levures diploïdes, le phénotype de croissance pseudohyphale est plus sévère. Il résulte d'une réponse à la privation d'azote et entraîne l'adhésion des cellules mères aux cellules filles en bourgeonnement, une morphogénèse allongée, une absence de division cellulaire, un cycle cellulaire bloqué en G1 et une invasion des milieux solides agar (Gimeno et al., 1992; Kron & Gow, 1995; Kron et al., 1994). La transition entre la croissance logarithmique et la croissance filamenteuse des levures nécessite une distribution cellulaire asymétrique de la protéine Ash1, exclusivement chez la cellule fille, qui possède dès lors la

capacité de produire des filaments. Ainsi, dans des conditions environnementales particulières, le facteur Ash1 régule la croissance pseudohyphale en activant l'expression du gène *FLO11* codant pour une protéine membranaire nécessaire à la formation de filaments et à la croissance invasive chez la levure (Pan & Heitman, 2000) (Wolf et al., 2010a).

1.4. La régulation du transport de l'ARNm *ASH1* favorise la localisation de la protéine Ash1

La localisation de la protéine Ash1 nécessite la localisation de son transcrite *ASH1* à l'extrémité du bourgeon durant la fin de l'anaphase. La localisation de l'ARNm *ASH1* est possible grâce aux éléments de localisation en *cis*, contenus dans sa séquence codante et son 3'UTR, ainsi qu'aux différentes protéines qui s'y lie en *trans*, notamment celles qui permettent son transport dirigé, qui sont codées par les gènes *SHE*.

1.4.1. Les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*

L'ARNm *ASH1* contient quatre éléments de localisation, soit l'élément E1, E2A, E2B et E3, qui sont positionnés le long de la séquence codante et du 3'UTR (**Figure 5**) (Chartrand et al., 1999; 2002; Gonzalez et al., 1999; Olivier et al., 2005). Chacun de ces éléments pris individuellement est suffisant pour diriger son transcrite dans le bourgeon de la cellule fille (Chartrand et al., 1999). Par ailleurs, quatre répétitions de l'élément de localisation E3 permettent une localisation du transcrite comparable à l'ARNm *ASH1* de type sauvage (Chartrand et al., 2002; Chung & Takizawa, 2010). Plus précisément, une analyse de structure du 3'UTR a démontré que la formation de structures secondaires et tertiaires formant une tige-

boucle d'au moins 118 nucléotides est nécessaire à la localisation de l'ARNm (Chartrand et al., 1999). En plus de présenter une délocalisation de l'ARNm, les mutations dirigées sur la tige-boucle affectent la formation de particules de localisation, ou complexe RNP, dont la migration intracellulaire fut observée par microscopie en temps réel dans les cellules vivantes (Bertrand et al., 1998) (Chartrand et al., 1999). En effet, la localisation de l'ARNm *ASH1* dépend de la structure tridimensionnelle de ses éléments de localisation, qui détermine la capacité d'interaction entre ses éléments de localisation et les facteurs nécessaires à la localisation (Olivier et al., 2005). D'ailleurs, des études à grande échelle ont validées la structure de ces éléments de localisation (Kertesz et al., 2010; Rouskin et al., 2014).

A



B

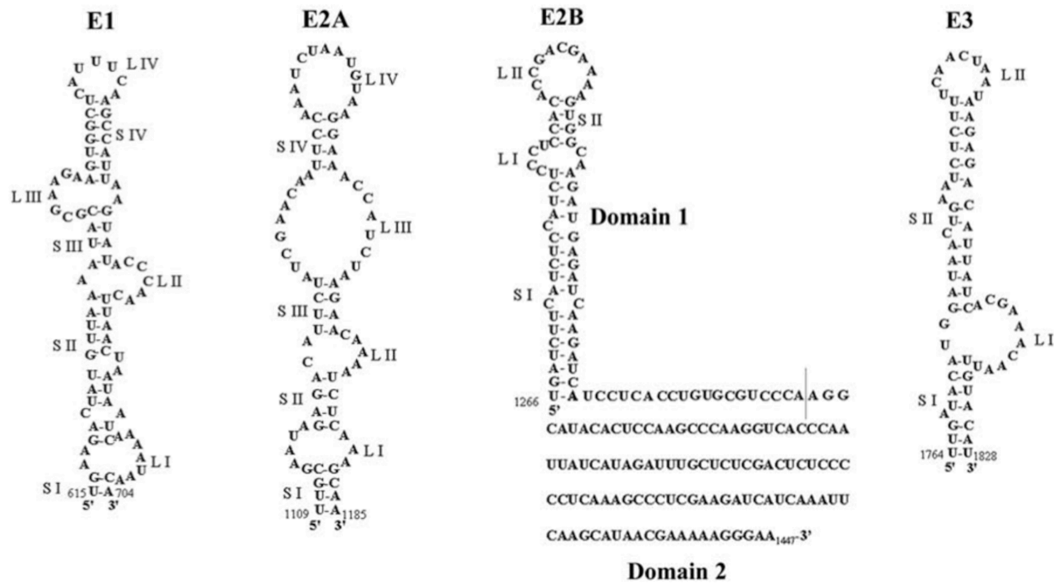


Figure 5. Les éléments de localisations de l'ARNm *ASH1*. (A) Schéma du positionnement des quatre éléments de localisation sur la séquence de l'ARNm *ASH1*. Les éléments E1, E2A et E2B sont inclus dans la séquence codante (1-1767 nt), tandis que l'élément E3 chevauche la séquence codante et le 3'UTR de l'ARNm *ASH1*. (B) Représentation des structures secondaires des éléments de localisation E1, E2A, E2B et E3 de l'ARNm *ASH1*. Source : (Chartrand et al., 2002; Olivier et al., 2005)

1.4.2. Les gènes *SHE* sont responsables de la localisation des ARNm au bourgeon des levures

Les facteurs essentiels pour la localisation du transcrit *ASH1* ont été déterminés par l'équipe du Dr. Kim Nasmyth, qui a développé un essai de génétique inverse basé sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1 (Jansen et al., 1996). En exploitant la fonction de répression transcriptionnelle du gène *HO* par la liaison de la protéine Ash1 sur l'élément URS2 de son promoteur, les chercheurs ont été capables de moduler et d'observer la croissance des levures ayant une DCA en comparaison aux autres levures ayant une division cellulaire symétrique. Pour ce faire, des gènes de sélection ont été fusionnés au promoteur du gène *HO* et introduits dans le génome de toutes les souches utilisées pour le criblage. La transcription de ces gènes de sélection est possible grâce au facteur Swi5 qui se lie au promoteur *HO*, seulement en l'absence du facteur Ash1 (Nasmyth, 1993). En effet, la présence de Ash1 bloque la liaison de Swi5 sur le promoteur *HO* et ainsi empêche la synthèse du transcrit de sélection (Bobola et al., 1996; Sil & Herskowitz, 1996). Lorsque l'ARNm *ASH1* est distribué de manière symétrique, les cellules filles et mères sont identiques et contiennent le facteur Ash1 dans leur noyau. Ainsi, le niveau de transcription du gène de sélection est complètement inhibé dans ces colonies comparativement aux colonies de types sauvages ayant une DCA normale et une localisation d'Ash1 dans les cellules filles exclusivement (Jansen et al., 1996). À partir de cette technique, cinq gènes impliqués dans la localisation de la protéine Ash1 et de son transcrit ont été identifiés et nommés *SHE* pour « swi5p HO-dependent Expression » (Jansen et al., 1996) (Bobola et al., 1996). Le gène *SHE1/MYO4* code pour une myosine de type V capable de se déplacer sur les filaments

d'actine (Takizawa et al., 2000). Plusieurs protéines Myo4 s'associent à l'ARNm *ASH1* pour augmenter l'efficacité de son transport (Chung & Takizawa, 2010). Le gène *SHE2* correspond à une protéine de liaison à l'ARN essentielle à la localisation de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2000) (Bohl et al., 2000). Le gène *SHE3* exprime une protéine d'échafaudage qui permet de faire le pont entre Myo4 et She2, ainsi que de favoriser l'interaction entre She2 et l'ARNm *ASH1* (Jansen et al., 1996; Müller et al., 2011). Le gène *SHE4* code pour un régulateur du repliement des myosines qui s'associe directement au domaine moteur des myosines pour exercer sa fonction (Lord et al., 2008; Shi & Blobel, 2010; Toi et al., 2003; Wesche et al., 2003). Finalement, le gène *SHE5/BNII* est impliqué dans le réarrangement du cytosquelette d'actine dans le bourgeon (Goode & Eck, 2007; Pruyne et al., 2004a; 2004b).

Les produits des trois premiers gènes *SHE* forment un complexe appelé le «locosome», qui permet le transport dirigé de l'ARNm *ASH1* sur les filaments d'actines (**Figure 6**). Ce déplacement est requis pour la localisation du transcrit *ASH1* à la partie distale du bourgeon de la levure et ainsi de la localisation d'Ash1 dans le noyau de la cellule fille spécifiquement (Bobola et al., 1996; Jansen et al., 1996). Par ailleurs, c'est en identifiant, à l'aide de la technique de co-Immuno-précipitation (co-IP), les transcrits associés à une protéine purifiée du locosome, She2, qu'il a été déterminé qu'environ une vingtaine d'ARNm sont localisés à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille (Oeffinger et al., 2007; Shepard et al., 2003).

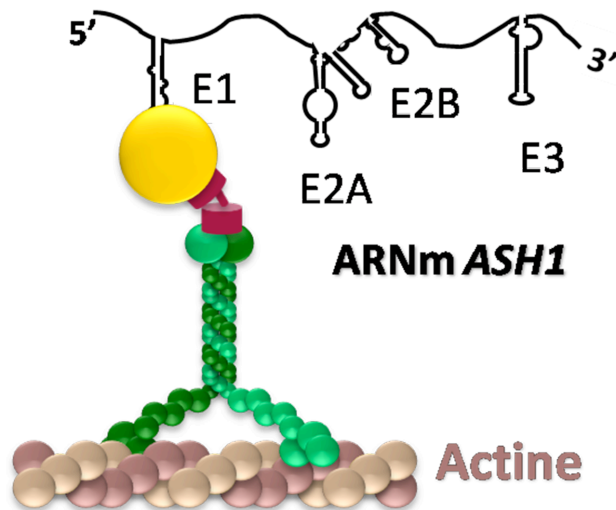


Figure 6. Les protéines She1/Myo4, She2 et She3 forment le locasome. La protéine She2, en jaune, se lie à tous les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*, tandis que la protéine motrice She1/Myo4, en vert, permet le déplacement du complexe RNP sur les filaments d'actine de la levure. Entre ces deux facteurs, la protéine d'échaffaudage She3, en rouge, permet leur association et ainsi la formation du locasome. Le locasome est nécessaire pour le transport dirigé de l'ARNm *ASH1* et sa localisation à la partie distale du bourgeon. Source : Modifié d'une correspondance personnelle de Nicolas Paquin.

1.4.3. La protéine She2 est déterminante pour la localisation des ARNm au bourgeon

La protéine She2 est localisée à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille et elle est requise pour la localisation de l'ARNm *ASH1* (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). She2 s'associe à tous les éléments de localisation du transcrit *ASH1* sous forme d'homodimère, qui forment ensuite des tétramères (Niessing et al., 2004) (Muller et al., 2009). Ces tétramères de She2 permettent le recrutement de plusieurs protéines motrices She1/Myo4 nécessaires au déplacement dirigé de l'ARNm *ASH1* du noyau de la cellule mère vers le bourgeon de la

cellule fille (Muller et al., 2009; Niessing et al., 2004). Le site de liaison à l'ARN de She2 se situe dans son domaine N-terminal et, lorsque muté, l'interaction entre She2 et l'ARNm *ASH1* est abolie, ainsi que leur localisation à la partie distale du bourgeon (Gonsalvez et al., 2003). De plus, auprès de ces mutants de liaison à l'ARN de She2, la localisation des protéines She1/Myo4 et She3 n'est plus observée, tandis que la formation du « locosome » est conservée (Gonsalvez et al., 2003). Inversement, les résidus nécessaires à l'interaction de She2 avec les ARNm localisés au bourgeon de la cellule fille ont été identifiés (Olivier et al., 2005). Ces sites de liaison comprennent un triplet de ribonucléotides CGA conservé et inclus dans une tige-boucle, ainsi qu'une cytosine simple dans l'autre tige-boucle du même élément de localisation (Olivier et al., 2005). La mutation dirigée de ce motif de liaison à She2 sur divers transcrits localisés, notamment l'ARNm *ASH1*, provoque la perte de l'interaction de She2, ce qui entraîne la délocalisation du transcrit *ASH1* et la distribution symétrique de la protéine Ash1 (Olivier et al., 2005). Ces différentes études démontrent l'importance de la liaison de She2 avec les éléments de localisation du transcrit *ASH1*, pour permettre son recrutement auprès du complexe de transport dirigé, le « locosome ».

She2 est une protéine qui voyage entre le cytoplasme et le noyau, et qui interagit spécifiquement avec l'ARNm *ASH1* dans les deux compartiments (Du et al., 2008; Kruse et al., 2002; Niessing et al., 2004). Notre laboratoire a identifié un signal de localisation nucléaire (NLS) non classique dans la séquence de She2, et qui est responsable de son transport dans le noyau via l'importine α Srp1, ainsi que de la distribution asymétrique de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1 (Shen et al., 2009). La présence de She2 dans le noyau permet l'association des facteurs nécessaires à la régulation de traduction de l'ARNm *ASH1*, et elle est essentielle à la localisation asymétrique de la protéine Ash1 (Shen et al., 2009).

Pour s'associer au transcrit *ASH1* dans le noyau, She2 est recrutée directement au complexe de la machinerie de l'élongation de la transcription de l'ARN polymérase II et elle se lie sur tous ses éléments de localisation durant sa synthèse (Shen et al., 2010a).

1.5. La régulation de la transcription de l'ARNm *ASH1* favorise la localisation de la protéine Ash1

La production de l'ARNm *ASH1* est effectuée par le complexe d'ARN polymérase II (Pol II), qui catalyse la transcription des ARNm à partir des doubles brins d'ADN (Roeder, 1996). La Pol II est constituée de 12 sous-unités numérotées Rpb1 à Rpb12, selon l'ordre de grandeur de chacun de leur poids moléculaire (Wooddell & Burgess, 2000). L'activité catalytique de transestérase provient essentiellement du coeur de la Pol II, formé de 10 sous-unités, et a la capacité de produire des ARNm *in vitro* à partir de brins d'ADN dénudés de chromatine (Edwards et al., 1991) (Christie et al., 1994). Les deux sous-unités restantes forment l'hétérodimère Rpb4/7 qui supporte l'initiation de la transcription ainsi que, dans des conditions de stress, la régulation post-transcriptionnelle des ARNm telle que la traduction et la dégradation dans le cytoplasme (Choder, 2004; Lotan et al., 2007; Rosenheck & CHODER, 1998; Selitrennik et al., 2006; Woychik & Young, 1989). Ce sous-complexe de la Pol II est un exemple d'implication possible des facteurs de transcription dans des phénomènes de régulation cytoplasmique des transcrits (Forget & Chartrand, 2011) en annexe 1.

La transcription des ARNm comprend trois phases: l'initiation, l'élongation et la terminaison. La phase d'initiation de la transcription correspond au moment où la Pol II, en association avec plusieurs facteurs généraux de la transcription (GTFs), forment le complexe

de préinitiation (PIC) et s'associent au promoteur grâce au complexe Médiateur (Woychik & Hampsey, 2002). Le large complexe Médiateur permet le remodelage de la chromatine ainsi que la reconnaissance des activateurs de gènes spécifiques en liaison avec leurs séquences d'ADN respectives sur le génome des levures (Davis et al., 2002). Par la suite, le complexe de la Pol II progresse le long des brins d'ADN pour synthétiser une séquence complémentaire correspondant à celle de l'ARNm naissant. Durant cette phase d'élongation, certains des facteurs faisant partie du PIC vont poursuivre la transcription avec le complexe de la Pol II en mouvement. D'ailleurs, la présence des GTFs, TFIIF et TFIIS, est suffisante pour maintenir la progression du taux d'élongation de la Pol II dans un système *in vitro* (Izban & Luse, 1992). De plus, divers complexes vont s'associer et se dissocier du complexe de la Pol II en mouvement pour permettre notamment la restructuration de la chromatine, la régulation de la transcription et la maturation de l'ARNm en cours de synthèse (Reese, 2013). Parmi ceux-ci, le complexe universel Spt4-Spt5, aussi connu chez les mammifères sous le nom du complexe DSIF (DRB sensitivity-inducing factor), régule la vitesse de la transcription de la Pol II (Wada et al., 1998).

1.5.1. Le complexe Spt4-Spt5 est une plateforme pour She2 impliquée dans la localisation de l'ARN *ASH1* et *Ash1*

Chez la levure *S. cerevisiae*, le complexe Spt4-Spt5 fut d'abord reconnu pour sa capacité à réparer les bris d'ADN causés par l'insertion du rétrotransposon Ty1 dans la région 5' non codante des gènes. Ainsi les facteurs Spt4 et Spt5 sont nommés *SPT* en référence au diminutif de « SuPpressor of Ty's » (Winston et al., 1984). Par la suite, plusieurs nouveaux rôles de l'hétérodimère Spt4-Spt5 ont été découverts. Par exemple, il a été démontré que les

facteurs Spt4 et Spt5 régulent la progression de la Pol II en élongation (Hartzog et al., 1998). De plus, Spt5 est aussi impliqué dans la maturation de l'ARNm naissant durant la phase d'élongation (Lindstrom et al., 2003). Finalement, ce complexe de régulation de la transcription est directement impliqué dans la localisation de certains ARNm chez la levure, notamment l'ARNm *ASH1* (Shen et al., 2010a).

Récemment, notre laboratoire a démontré que l'association de She2 avec l'ARNm doit se produire dans le noyau au moment de l'élongation du transcrit pour conserver la localisation de l'ARNm *ASH1* au bourgeon de la cellule fille (Shen et al., 2009) (Shen et al., 2010a). En effet, des mutations dans les gènes *SPT4* ou *SPT5* réduisent le recrutement co-transcriptionnel du facteur She2, ce qui cause un défaut de localisation de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1. She2 s'associe aux éléments de localisation durant la synthèse des transcrits cibles. Ces liaisons ont été observées à l'aide de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) accompagnée d'un traitement des échantillons avec des enzymes de digestion de l'ARN (Rnases). La technique de ChIP permet de détecter les séquences d'ADN/ARN associées à la protéine d'intérêt purifiée par immunoprécipitation (IP), en l'occurrence She2, alors que le traitement avec les Rnases permet d'établir que les séquences d'ADN/ARN détectées sont majoritairement des séquences d'ARN. Ainsi, l'hétérodimère Spt4-Spt5 est nécessaire au phénomène de la localisation des ARNm, en servant de plateforme pour le recrutement co-transcriptionnel de She2 sur les éléments de localisation des ARNm au moment de leur synthèse (**Figure 7**).

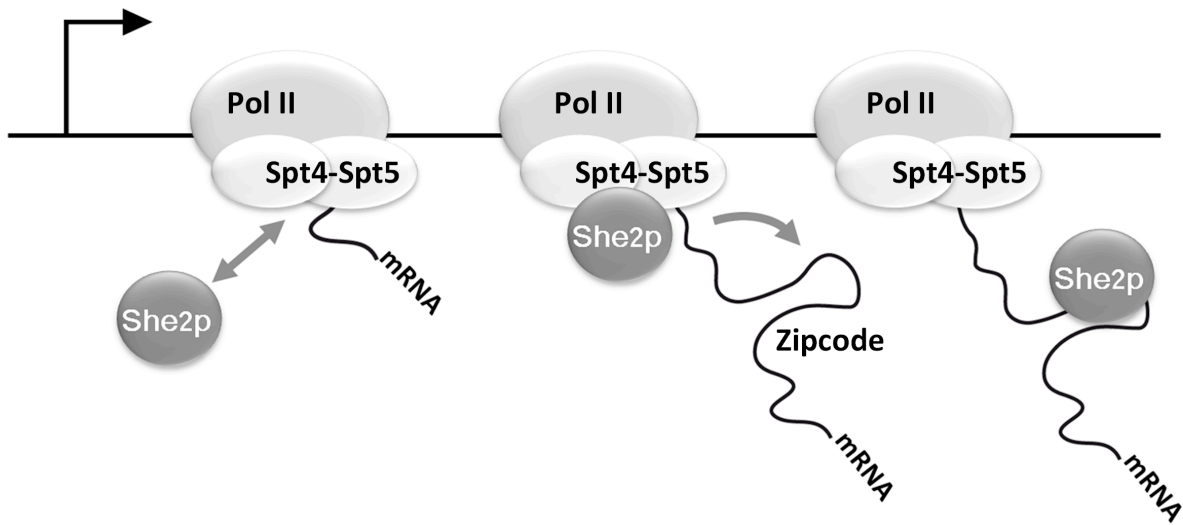


Figure 7. L'hétérodimère Spt4-Spt5 permet le recrutement co-transcriptionnel de She2 sur les éléments de localisation ou « zipcode » des ARNm en synthèse. Le facteur She2 se lie au dimère de régulation de l'élongation Spt4-Spt5 recruté auprès du complexe de la machinerie de la transcription de l'ARN polymérase II (Pol II). Lorsqu'un site de liaison ou « zipcode » est formé, She2 s'associe directement sur ce dernier. Ainsi, Spt4-Spt5 forme une plateforme de recrutement co-transcriptionnel de She2 et favorise son association avec les éléments de localisation des ARNm cibles pendant leur synthèse. Publié dans : (Shen et al., 2010a)

1.6. La régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* favorise la localisation de la protéine Ash1

La localisation de l'ARNm *ASH1* amène l'accumulation de protéines Ash1 à la fin de l'anaphase seulement à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille et permet la DCA des levures. Toutefois, la vitesse de transport intracellulaire de l'ARNm *ASH1* ne serait pas suffisamment rapide pour empêcher l'expression d'Ash1 à l'intérieur de la cellule mère (Bertrand et al., 1998). Pour permettre à la localisation du transcrit *ASH1* de précéder l'expression de la protéine Ash1, il existe des mécanismes de régulation de sa traduction.

La régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* se produit principalement au moment de l'initiation de la traduction, comme chez plusieurs eucaryotes (Klann & Dever, 2004). La phase d'initiation de la traduction chez les eucaryotes est définie par l'assemblage d'un complexe ribosomal compétent (80S) sur le codon d'initiation AUG d'un transcrit. Ceci permet le début de la synthèse d'une chaîne d'acides aminés correspondant à la séquence primaire de la protéine. L'initiation de la traduction est favorisée par divers complexes regroupant de nombreux facteurs d'initiation de la traduction conservés chez les eucaryotes (eIF) (**Figure 8**).

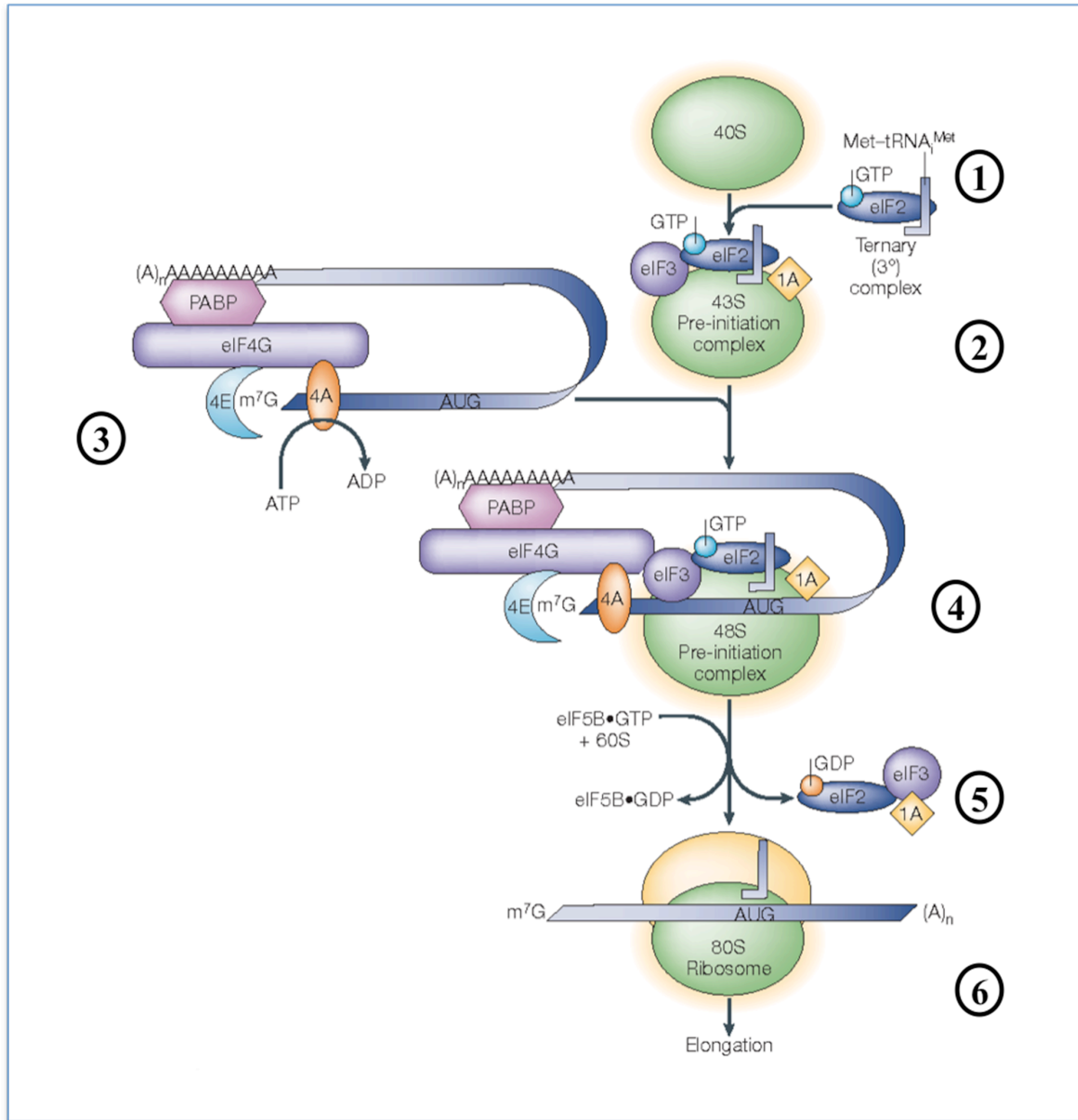


Figure 8. L'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Le complexe ternaire est formé d'une molécule de GTP associé au facteur d'initiation de la traduction 2 (eIF2) et à l'ARN de transfert (ARNt) de la méthionine (1). Par la suite, le complexe ternaire s'associe à la petite sous-unité du ribosome 40S pour former le complexe de pré-initiation 43S (2). Le complexe eIF4F s'associe à la coiffe 7-methyl guanosine (m^7G) de l'ARNm à traduire et à la protéine PABP (3). Dans cette configuration, l'ARNm s'associe au complexe 43S pour former le complexe de pré-initiation 48S (4). Associé au codon initiateur, le facteur eIF2 hydrolyse la

molécule de GTP en GDP sous l'influence de la protéine eIF5B et se dissocie du complexe avec d'autres eIFs (5). Ainsi, eIF5B permet le recrutement de la grande sous-unité 60S pour former le complexe 80S, capable d'initier la traduction du transcrit présent et l'élongation de la protéine (6). Source : (Klann & Dever, 2004)

Tout d'abord, le complexe de préinitiation (43S) est formé à partir du complexe ternaire et de la petite sous-unité du ribosome (40S). Le complexe ternaire comporte le facteur eIF2 couplé à une molécule de GTP et associé à l'ARNt de la méthionine. L'association de ce complexe avec le 40S pour former le 43S est supportée par les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 (Klann & Dever, 2004). Ensuite, le complexe 43S s'associe avec l'ARNm à traduire pour former le complexe 48S capable de balayer le 5'UTR du transcrit à la recherche de son codon d'initiation AUG et de s'y fixer. Pour ce faire, l'ARNm est recruté par le complexe eIF4F qui est composé des facteurs eIF4A, eIF4E et eIF4G (Klann & Dever, 2004). eIF4A est une hélicase à ARN qui catalyse l'abolition des structures secondaires présentes dans le 5'UTR du transcrit (Gingras et al., 1999). Les facteurs eIF4E et eIF4G s'associent respectivement à la coiffe triméthyl guanosine et à la partie 5'UTR de l'ARNm pour stimuler le processus d'initiation de la traduction (Wells et al., 1998). En effet, la protéine eIF4E se lie directement à la coiffe de l'ARNm et le facteur eIF4G s'associe à la protéine Pab1, elle-même combinée à la queue poly(A) de l'ARNm, favorisant une circularisation du transcrit (Gingras et al., 1999). Dans cette configuration, le complexe eIF4F s'associe au complexe 43S par l'intermédiaire du facteur eIF3 et forme le complexe 48S. Le complexe 48S est maintenant capable de repérer le codon AUG. Une fois le codon initiateur détecté, la grande sous-unité du ribosome (60S) est recrutée pour former un complexe ribosomal compétent (80S). À ce moment, sous l'influence de la protéine eIF5B, le facteur eIF2 hydrolyse la molécule de GTP en GDP et ainsi se dissocie du complexe avec d'autres eIFs. De plus, eIF5B promeut l'association du 60S à la

petite sous-unité 40S liée à l'ARNm pour former le complexe 80S, capable d'initier la traduction du transcrit présent (Klann & Dever, 2004) (Algire & Lorsch, 2006). Chez la levure, la coordination des divers complexes permettant l'initiation de la traduction est conservée. Toutefois, les homologues des eIF sont parfois identifiés par d'autres termes, tels que les gènes homologues des facteurs eIF4G et eIF5B qui sont aussi nommés TIF4631/TIF4632 et FUN12, respectivement.

Il a été démontré que l'initiation de la traduction est impliquée dans la localisation de l'ARNm *ASH1* et d'Ash1. En effet, en l'absence d'un codon initiateur AUG fonctionnel, le messenger *ASH1* est localisé dans le bourgeon, mais ne forme pas de croissant à son extrémité, comparativement à l'ARNm *ASH1* endogène (Gonzalez et al., 1999). De plus, la délétion de plusieurs gènes codant pour certaines protéines ribosomales perturbe la localisation de l'ARNm *ASH1* (Komili et al., 2007). Ainsi, l'initiation de la traduction est nécessaire à l'ancrage du transcrit *ASH1* pour permettre sa localisation à l'extrémité distale de la cellule fille (Gonzalez et al., 1999).

La présence et l'emplacement des éléments de localisation sur l'ARNm *ASH1* favorise aussi la régulation de son taux de traduction. En effet, le déplacement de tous les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* vers son 3'UTR entraîne une augmentation de sa traduction et une délocalisation de la protéine Ash1 (Chartrand et al., 2002). Inversement, l'ajout d'une tige boucle inhibant la traduction rétablit la localisation de la protéine Ash1 (Chartrand et al., 2002). De plus, divers répresseurs traductionnels s'associent à l'ARNm *ASH1* pour permettre la régulation de l'expression d'Ash1 (Gu et al., 2004; Irie et al., 2002; Long et al., 2001). Les répresseurs traductionnels Khd1 et Puf6 empêchent l'initiation de la traduction de l'ARNm

ASH1 en s'associant aux eIF de la levure eIF4G1 et Fun12 (eIF5B), respectivement (Paquin et al., 2007) (Deng et al., 2008). De plus, la phosphorylation de Khd1 et Puf6 favorise l'ancrage de l'ARNm *ASH1* et l'initiation de la traduction à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille, et ainsi promeut la localisation de la protéine Ash1 (Paquin et al., 2007) (Deng et al., 2008).

1.6.1. Les répresseurs traductionnels de l'ARNm *ASH1*

Les facteurs nécessaires à la répression traductionnelle de l'ARNm *ASH1* permettant la régulation de son niveau de traduction durant le transport sont : Khd1, Puf6 et Loc1. En absence de ceux-ci, la protéine Ash1 est exprimée durant le transport dirigé de l'ARNm *ASH1* et est relocalisée dans le noyau de la cellule fille ainsi que dans le noyau de la cellule mère (**Figure 9**). Dans ces conditions, la division cellulaire de la levure est symétrique. Pour permettre la DCA, la levure en bourgeonnement doit favoriser la répression traductionnelle de l'ARNm *ASH1* tout au long de son transport, jusqu'à son ancrage au bourgeon de la cellule fille. Par la suite, l'expression de l'ARNm *ASH1* est initiée et la protéine Ash1 est relocalisée exclusivement dans le noyau de la cellule fille, après la cytokinèse (Besse & Ephrussi, 2008; Paquin & Chartrand, 2008).

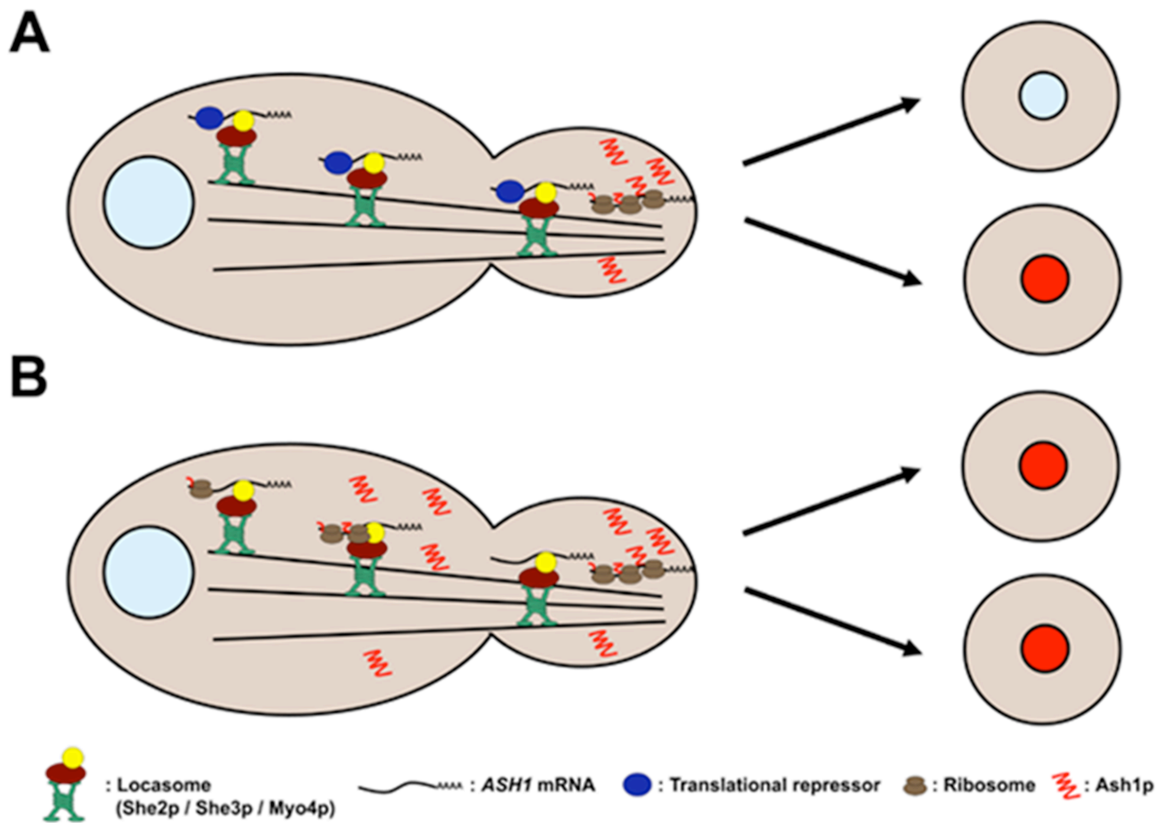


Figure 9. La repression de la traduction de l'ARNm *ASH1* durant le transport permet la DCA. (A) Dans les souches sauvages, l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1* est inhibée durant son transport jusqu'à son ancrage. L'expression d'Ash1 à l'extrémité du bourgeon permet sa relocalisation dans le noyau de la cellule-fille exclusivement. Ainsi, la cellule-fille se distingue de la cellule-mère et la division est asymétrique. (B) Dans les souches contenant des mutations au niveau de la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*, la protéine Ash1 est exprimée durant le transport et sa distribution est symétrique, c'est-à-dire qu'Ash1 est relocalisée dans les noyaux des deux cellules en division. Source : (Paquin & Chartrand, 2008)

1.6.1.1. Khd1

La protéine Khd1 (KH-domain protein 1) a été identifiée par le groupe de recherche d'Ira Herskowitz. Les auteurs ont effectué un criblage des gènes codant pour des protéines de liaison à l'ARN pouvant affecter la localisation de l'ARNm *ASH1*, observée au microscope grâce à la technique de FISH. Les souches ayant une délétion des gènes *PUF5*, *SCPI60* et *KHDI* affichaient toutes un défaut de localisation de l'ARNm *ASH1*. Cependant, contrairement aux protéines Scp160 et Puf5, seule la protéine Khd1 est colocalisée et interagit avec l'ARNm *ASH1* à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille. (Irie et al., 2002)

À ce jour, Khd1 est reconnue pour interagir avec plus de 1200 transcrits chez la levure *S. cerevisiae* (Hasegawa et al., 2008; Hogan et al., 2008; Wolf et al., 2010b). Khd1 possède trois domaines KH, qui sont des domaines de liaison à l'ARN homologues à ceux de la protéine humaine « heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K » (Siomi et al., 1993). Il est connu que ces domaines possèdent une plus grande affinité pour les régions d'ARN simple brin riches en cytosine et en uracile (Denisenko & Bomszyk, 2002). En effet, Khd1 semble s'associer sur les séquences répétitives CNN de plusieurs ARNm, incluant le domaine N-terminal de l'ARNm *ASH1* (Hasegawa et al., 2008). Pour illustrer cette découverte, la séquence de liaison de Khd1 est caractérisée sur l'ARNm *FLO11* comme étant CAUCAUCA (Wolf et al., 2010b). Néanmoins, la régulation traductionnelle provoquée sur chacun d'entre eux peut différer (Hasegawa et al., 2008).

Pour déterminer la fonction de Khd1 par rapport à la localisation de l'ARNm *ASH1*, les chercheurs du groupe d'Ira Herskowitz ont utilisé l'essai de génétique basé sur la distribution

asymétrique de la protéine Ash1 (Irie et al., 2002). Cette étude suggère que *KHDI* interagit génétiquement avec les gènes *SHE* codants pour le « locosome » responsable du transport, mais influence de manière différente la localisation de l'ARNm *ASHI* et d'Ash1 (Irie et al., 2002). Toutefois, contrairement à l'équipe de recherche d'Ira Herskowitz, notre laboratoire n'a observé aucune anomalie au niveau de la localisation de l'ARNm *ASHI* dans les souches *khd1*, analysées par une technique de FISH plus précise, à l'aide de sondes d'ARNm plus spécifiques (Paquin et al., 2007). L'absence de Khd1 dans les levures entraîne une délocalisation de la protéine Ash1, observée par fluorescence au microscope (Paquin et al., 2007). De plus, la surexpression de *KHDI* cause une diminution du niveau de protéine Ash1 (Irie et al., 2002). Inversement, les expériences de délétion du gène *KHDI* amplifient l'expression d'Ash1 sans toutefois affecter le niveau des ARNm *ASHI*, mais bien la quantité de polysomes qui lui sont associés (Paquin et al., 2007). Ainsi, il a été démontré que Khd1 inhibe la traduction de l'ARNm *ASHI* pour permettre la localisation de la protéine Ash1.

Pour réprimer la traduction de l'ARNm *ASHI* durant le transport cytoplasmique, Khd1 s'associe directement avec la partie 5' du transcrit, correspondant aux 800 premiers nucléotides de la séquence codante (Irie et al., 2002). Néanmoins, les séquences répétitives de liaisons CNN identifiées sur l'ARNm *ASHI* sont situées en aval de l'élément de localisation E1, entre les nucléotides 251-600 de la séquence codante (Hasegawa et al., 2008). L'absence de ces nucléotides sur le transcrit *ASHI* entraîne la perte partielle de colocalisation *in vivo* entre la protéine Khd1 et l'ARNm *ASHI* (Hasegawa et al., 2008). Toutefois, notre laboratoire avait établi précédemment que l'élément de localisation E1 de l'ARNm *ASHI*, compris entre les nucléotides 621-900, est essentiel à l'association de Khd1 recombinante *in vitro* (Paquin et al., 2007). En effet, la présence de l'élément de localisation E1 sur l'ARNm *ASHI* est

nécessaire à la fonction de répression traductionnelle de Khd1, contrairement à la séquence codante comprise entre les nucléotides 1-621 (Paquin et al., 2007). De plus, l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm cause une accumulation de Khd1 dans le noyau, suggérant que pour effectuer sa fonction, Khd1 aurait besoin de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme pour s'associer à ses ARNm cibles (Du et al., 2008).

La liaison de Khd1 sur l'ARNm *ASH1* bloque l'initiation de sa traduction en s'associant aussi avec le domaine C-terminal du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 chez la levure, homologue de la protéine eIF4G chez les eucaryotes (Paquin et al., 2007). Le facteur eIF4G s'associe à la coiffe de l'ARNm via eIF4E et la queue poly(A) avec Pab1 pour favoriser la circularisation du transcrit et la formation du complexe 48S (Gingras et al., 1999). Ainsi, l'association de Khd1 avec le facteur eIF4G1 réprime possiblement l'initiation de la traduction, bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu (Paquin et al., 2007). L'expression de l'ARNm *ASH1* est favorisée à la suite de modifications post-traductionnelles du facteur de répression Khd1. En effet, les protéines à domaines KH, notamment Khd1, ont été identifiées comme des phosphoprotéine *in vivo* et *in vitro* par des études à grande échelle explorant la phosphorylation des protéines de la levure (Chi et al., 2007; Hüttelmaier et al., 2005; Ostareck-Lederer et al., 2002). La kinase responsable de la phosphorylation de Khd1 est la caséine kinase 1 (Yck1), une kinase ancrée à la membrane plasmique (Paquin et al., 2007; Ptacek et al., 2005). Il a été démontré que Khd1 et Yck1 interagissent sur l'ensemble de la membrane plasmique des levures *S. cerevisiae*, possiblement due à l'interaction de Khd1 avec d'autres ARNm (Paquin et al., 2007). Néanmoins, la phosphorylation de Khd1 par Yck1 entraîne l'activation de la traduction de l'ARNm *ASH1* à son site de localisation, qui est à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille (Paquin et al., 2007).

1.6.1.2. Puf6

La protéine Puf6 a été identifiée par le groupe de recherche de Robert H. Singer comme faisant partie du complexe RNP associé à l'ARNm *ASH1* (Gu et al., 2004). Le complexe RNP de l'ARNm *ASH1* a été isolé par une technique de purification par co-IP de la protéine She2 fusionnée avec un épitope TAP (Gu et al., 2004; Puig et al., 2001). Les facteurs présents dans le même complexe que She2-TAP ont été identifiés par spectrométrie de masse (Gu et al., 2004). L'analyse structurale de motifs protéiques observés dans le complexe RNP de l'ARNm *ASH1* a permis de découvrir une nouvelle protéine PUF chez la levure, Puf6 (Gu et al., 2004). La famille PUF englobe toutes les protéines ayant un domaine de liaison à l'ARN similaire à la protéine Pumilio chez la *Drosophila melanogaster* et au facteur de liaison à l'ARNm Fem-3 chez *Caenorhabditis elegans*, où celui-ci a été identifié (Zamore et al., 1997; Zhang et al., 1997). Ce domaine de liaison à l'ARN est répétitif et grandement conservé (Wang et al., 2002). La fonction la mieux caractérisée des PUFs est la répression post-transcriptionnelle (Quenault et al., 2011). Les protéines PUF lient des séquences répétitives de tétranucléotides, soit UGUR, situé dans le 3'UTR de leurs ARNm cibles, affectant ainsi leur expression et leur stabilité (Wickens et al., 2002). D'ailleurs, Puf6 s'associe directement *in vivo* et *in vitro* sur des séquences semblables, soit UUGU, présentes dans le 3'UTR de l'ARNm *ASH1*, proche de l'élément de localisation E3 (Gu et al., 2004). La mutation de ce site de liaison sur l'ARNm *ASH1* ou l'absence de Puf6 perturbe la distribution asymétrique de la protéine Ash1 observée par des techniques de microscopie (Gu et al., 2004). De plus, Puf6 est localisée majoritairement dans le noyau et nécessite spécifiquement la présence de l'élément E3 de l'ARNm *ASH1* pour être observé à l'extrémité du bourgeon de la cellule fille (Gu et al., 2004).

Une étude récente provenant de notre laboratoire a révélé que le recrutement de Puf6 sur l'ARNm *ASH1* est effectué dans le noyau et est fonction de la présence de She2 (Shen et al., 2009). En effet, une expérience de mutagenèse dirigée du NLS de She2 entraîne la réduction de la liaison de Puf6 sur l'ARNm *ASH1* (Shen et al., 2009). De plus, l'interaction de Puf6 avec She2 nécessite la localisation nucléaire de She2 et est indépendante de la présence d'ARNm (Shen et al., 2009). Ainsi, le recrutement de Puf6 pourrait avoir lieu de manière co-transcriptionnelle, tel que le recrutement de She2, par l'intermédiaire du complexe Spt4-Spt5 (Shen et al., 2010a). D'ailleurs, le groupe de recherche de Grant A. Hartzog a identifié plusieurs facteurs, notamment Puf6, associés au complexe d'élongation de la transcription grâce à l'immunoprécipitation de la protéine Spt5 fusionnée avec l'épitope FLAG (Lindstrom et al., 2003). Toutefois, cette interaction n'a pas été confirmée.

La fonction de répression traductionnelle de Puf6 sur l'ARNm *ASH1* a été confirmée par l'utilisation de l'essai de génétique basé sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1 développé par le groupe de recherche de Kim Nasmyth (Jansen et al., 1996). Les résultats de cet essai ont permis de démontrer que la délétion du gène *PUF6* entraîne un défaut partiel d'accumulation de Ash1 dans la cellule fille. L'absence de Puf6 dans les cellules mène à une augmentation du niveau de l'expression d'Ash1 sans affecter le niveau relatif des transcrits *ASH1*. De plus, l'introduction d'une tige boucle servant à bloquer la traduction permet de récupérer le phénotype de localisation de la protéine Ash1. Inversement, l'augmentation du niveau de Puf6 recombinante dans un essai de traduction *in vitro* cause une diminution de l'expression du transcrit rapporteur contenant l'élément de localisation E3. Toutefois, la délocalisation du transcrit *ASH1* observée par technique de FISH est partielle dans les souches *puf6*, c'est-à-dire que l'ARNm *ASH1* présente une accumulation plus diffuse dans le bourgeon

de la cellule fille. Ainsi, Puf6 influence peu la localisation de l'ARNm *ASH1*, mais favorise la localisation de la protéine Ash1 en réprimant son expression (Gu et al., 2004).

Puf6 est aussi impliquée dans la maturation des ribosomes puisque la délétion du gène *PUF6* entraîne l'accumulation de la sous-unité 48S et la diminution de la formation du ribosome 80S mature (Lee et al., 2007). D'ailleurs, pour mieux comprendre le mécanisme de répression traductionnelle de Puf6, le groupe de Robert H. Singer a étudié l'interaction probable entre Puf6 et le facteur d'initiation de la traduction Fun12 chez la levure, homologue du facteur eIF5B chez les eucaryotes (Deng et al., 2008). La protéine eIF5B permet l'assemblage des sous-unités du ribosome nécessaires à l'initiation de la traduction (Klann & Dever, 2004). La protéine Fun12 interagit avec Puf6 en présence d'ARNm (Deng et al., 2008). Cette interaction ARN-dépendante fut démontrée par la technique de co-IP accompagnée d'un traitement des échantillons avec des enzymes de digestion de l'ARN (RNase). Ainsi, Puf6 liée sur l'ARNm *ASH1* réprime sa traduction en interagissant avec le facteur d'initiation de la traduction Fun12 (Deng et al., 2008).

Puf6 possède deux domaines essentiels à sa fonction : le domaine PUF et le domaine N-terminal (Deng et al., 2008). Le domaine PUF de liaison à l'ARN est nécessaire à son interaction avec Fun12, tandis que la séquence du domaine N-terminal possède des sites de phosphorylation (Deng et al., 2008). La présence de site de phosphorylation dans le domaine N-terminal de Puf6 diffère des autres protéines PUFs chez la levure, qui n'en possèdent pas (Wickens et al., 2002). Ceci suggère que la phosphorylation de Puf6 pourrait avoir une fonction d'activation de la traduction de l'ARNm *ASH1*, similaire à celle de Khd1. En effet, l'inhibition de la phosphorylation de Puf6 par mutagenèse dirigée diminue le niveau

d'expression d'Ash1 et ainsi augmente la répression traductionnelle de l'ARNm *ASH1* (Deng et al., 2008). La kinase responsable de la phosphorylation de Puf6 est la protéine Caséine Kinase II (CK2), dont une sous-unité catalytique (*cka2*) est reconnue comme étant associé à She2-TAP (Gu et al., 2004). De plus, la phosphorylation de Puf6 par la protéine CK2 favorise la traduction de l'ARNm *ASH1* (Deng et al., 2008). Ainsi, il existe une similarité entre les mécanismes moléculaires de Puf6 et de Khd1 pour permettre la répression traductionnelle de l'ARNm *ASH1*. D'ailleurs, la délétion des gènes codant pour les facteurs associés aux mécanismes d'action régulant la traduction de l'ARNm *ASH1* tels que *FUN12*, *CKA2* et *YCK1* entraîne aussi la délocalisation de l'ARNm *ASH1* et d'Ash1 (Deng et al., 2008).

1.6.1.3. Loc1

La protéine Loc1, nommée ainsi pour « **L**ocalization of mRNA 1 », fut découverte en 2001 par le groupe de recherche de Robert H. Singer, qui a effectué un criblage de banque d'ADN par technique de triple hybride pour identifier de nouvelles protéines associées aux éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2001). La technique de triple hybride s'effectue dans le noyau de la levure *S. cerevisiae* et elle permet d'observer l'interaction de protéines d'intérêt sur une séquence d'ARN spécifique (SenGupta et al., 1996). Ainsi, il a été découvert que Loc1 est associée aux séquences correspondant aux éléments de localisation E1 et E3 de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2001). Étant donné que l'élément E3 chevauche le 3'UTR, qui est mieux caractérisé comme site de régulation des ARNm, les auteurs ont confirmé plus précisément son interaction *in vitro* et *in vivo* avec Loc1 (Long et al., 2001).

L'association de Loc1 sur l'élément E3 est nécessaire à la localisation de l'ARNm *ASH1* et d'Ash1 (Long et al., 2001). D'ailleurs, la délétion du gène *LOCI* entraîne une

diminution de la localisation de l'ARNm *ASH1* et une distribution d'Ash1 symétrique (Long et al., 2001). Le phénotype observé est partiel et similaire à celui des souches de délétion du gène *PUF6* (Gu et al., 2004). De plus, le niveau d'expression des protéines Ash1 augmente dans les souches *loc1* comparativement aux souches sauvages, contrairement au niveau d'ARNm *ASH1* qui reste similaire (Komili et al., 2007). Ainsi, cela suggère un rôle de Loc1 dans l'inhibition de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

La fonction de répression traductionnelle de la protéine Loc1 est expliquée notamment par son implication dans l'assemblage des ribosomes. En effet, la protéine Loc1 est associée au complexe pré-ribosomal 66S et elle est requise pour la biogenèse de la sous-unité 60S du ribosome (Harnpicharnchai et al., 2001). De plus, elle est nécessaire à la maturation des précurseurs d'ARN ribosomiaux correspondant à la large sous-unité du ribosome (Urbinati et al., 2006). D'ailleurs, plusieurs études à grande échelle ont observé que Loc1 est associée à diverses protéines ribosomales (Collins et al., 2007; Komili et al., 2007). Ainsi, Loc1 possède un rôle dans la biogenèse des ribosomes, comme plusieurs autres facteurs de régulation de la traduction tels que Puf6, Fun12 et eIF4G (Li et al., 2009).

La protéine Loc1 est localisée exclusivement dans le noyau, contrairement aux répresseurs traductionnels Khd1 et Puf6, qui exercent leur fonction dans le cytoplasme (Long et al., 2001). Néanmoins, Puf6 fut identifiée parmi les facteurs en complexe avec la protéine Loc1 (Komili et al., 2007). De plus, de la même manière que Puf6, notre laboratoire a démontré que She2 nucléaire interagit avec Loc1 et permet son recrutement sur l'ARNm *ASH1* (Shen et al., 2009). Cette interaction spécifique et directe, entre Loc1 et She2, est requise pour la fonction de répression traductionnelle de Loc1 sur l'ARNm *ASH1* (Niedner et

al., 2013). Loc1 semble aussi être présente sur le complexe de la transcription en élongation, immunoprécipité avec le facteur Spt5-FLAG (Lindstrom et al., 2003). Toutefois, les chercheurs ayant élaboré cette expérience suggèrent que l'interaction entre Spt5-FLAG et Loc1 serait un artéfact, contrairement à Puf6, qui a été aussi observée dans le même complexe (Lindstrom et al., 2003).

1.7. Mise en contexte

Tel que décrit précédemment, différents facteurs sont impliqués dans la régulation de la localisation de l'ARNm *ASH1* au niveau de la transcription, du transport et de la traduction, pour permettre la localisation de la protéine Ash1 (**Figure 10**). En effet, suite à la localisation de l'ARNm *ASH1*, l'expression d'Ash1 exclusivement à l'extrémité du bourgeon permet sa relocalisation dans le noyau de la cellule fille et la DCA de la levure *S. cerevisiae*. Pour ce faire, la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* est régie par trois répresseurs traductionnels connus, soit Khd1, Puf6 et Loc1.

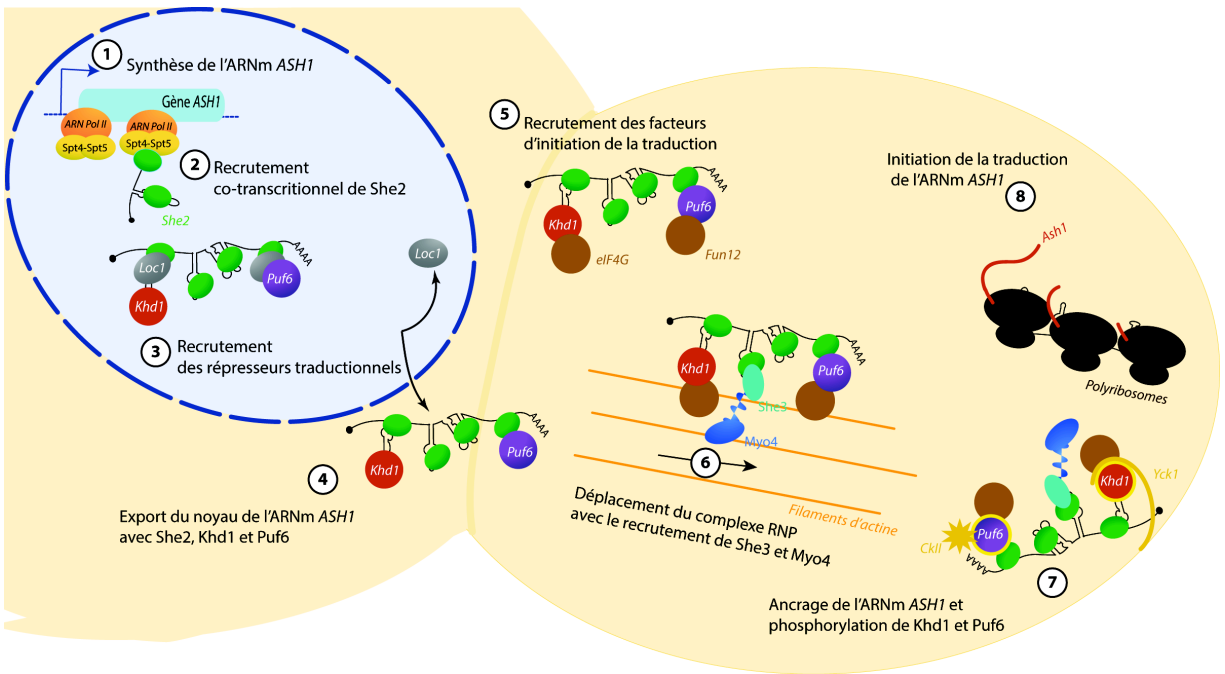


Figure 10. Modèle détaillé des mécanismes de régulation de la localisation de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1. Le gène *ASH1* est transcrit par le complexe d'élongation de l'ARNm polymérase II comprenant le dimère Spt4/5 (1), qui permet le recrutement de She2 sur tous les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* (2). Par la suite, les répresseurs traductionnels sont recrutés sur les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* (3), soit Loc1

sur les éléments E1 et E3, Khd1 sur l'élément E1 et Puf6 sur l'élément E3. L'ARNm *ASH1* est exporté du noyau en complexe avec She2, Khd1 et Puf6 (4). Dans le cytoplasme, les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G et Fun12 sont recrutés au complexe ribonucléoprotéiques (RNP). Cependant, leur fonction est inhibée par Khd1 et Puf6, respectivement (5). Les facteurs She3 et Myo4 s'ajoutent aux protéines She2 pour former le « locosome » et permettre le transport du complexe RNP le long des filaments d'actine (6). À l'extrémité du bourgeon, Khd1 et Puf6 sont phosphorylées par la caséine kinase I (Yck1) et II (CK2), respectivement (7). Ainsi, l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1* a lieu localement (8), menant à la présence d'Ash1 uniquement dans le noyau de la cellule-fille, ce qui est essentiel au phénomène de division cellulaire asymétrique chez la levure *S. cerevisiae*.

D'une part, l'initiation de la régulation de la localisation de l'ARNm *ASH1* s'effectue durant la transcription du gène *ASH1*. En effet, notre laboratoire a récemment démontré qu'en s'associant avec la protéine She2, le dimère de régulation d'élongation de la transcription Spt4/5 est nécessaire à la localisation de l'ARNm *ASH1* (Shen et al., 2010a). En plus de s'associer à She2, Spt4/5 semble aussi interagir avec Puf6 et Loc1 (Lindstrom et al., 2003). De plus, la localisation nucléaire de She2 est nécessaire à la liaison de Loc1 et Puf6 sur l'élément de localisation E3 de l'ARNm *ASH1* dans le noyau (Shen et al., 2009). Par ailleurs, la localisation nucléaire de Khd1 supporte aussi sa fonction (Du et al., 2008). Toutefois, le site de liaison de Khd1 sur l'ARNm *ASH1* semble controversé. Néanmoins, la présence de l'élément de localisation E1 est essentielle à la fonction de répression traductionnelle de Khd1 (Paquin et al., 2007). Ainsi, la liaison des facteurs de répression traductionnelle contrôlant l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1* pourrait avoir lieu dans le noyau, par l'intermédiaire du facteur d'élongation de la transcription Spt4/5. Toutefois, il n'existe aucune étude traitant du recrutement des répresseurs traductionnels sur l'ARNm *ASH1*.

D'autre part, seulement deux répresseurs traductionnels sont présents dans le cytoplasme, soit Khd1 et Puf6, puisque Loc1 est strictement localisé dans le noyau. Ces protéines nucléo-cytoplasmiques sont impliquées dans des mécanismes d'action moléculaires similaires, elles inhibent la traduction de l'ARNm *ASH1* durant le transport en s'associant à des facteurs d'initiations de la traduction et permettent l'expression d'Ash1 suite à leur phosphorylation (Besse & Ephrussi, 2008). Néanmoins, Khd1 et Puf6 supportent leur fonction par l'intermédiaire d'interactions avec des protéines différentes et avec deux éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* distincts, soit E1 et E3, respectivement. Khd1 requiert la présence de l'élément de localisation E1 pour empêcher la traduction de l'ARNm *ASH1* en s'associant au facteur d'initiation de la traduction eIF4G1, tandis que Puf6 interagit avec l'élément de localisation E3 pour bloquer la synthèse de la protéine Ash1 en se liant à un autre facteur d'initiation de la traduction, Fun12. Arrivé à destination, l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1* est favorisée par la phosphorylation de Khd1 et de Puf6, qui est effectuée par les caséines kinases Yck1 et CK2, respectivement. Ainsi, il n'est pas clair si les protéines Khd1 et Puf6 sont impliquées dans deux voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* distinctes et ont un effet additif sur la répression de la traduction de *ASH1*, ou ils agissent indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, l'importance d'avoir deux voies distinctes de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* demeure peu étudiée.

1.8. Hypothèse

Mon projet de recherche consiste à étudier les mécanismes de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* nécessaires à la localisation de la protéine Ash1. Mon hypothèse est qu'il existe une collaboration entre les différents répresseurs traductionnels de l'ARNm *ASH1*, soit Khd1, Puf6 et Loc1. Mon premier objectif de recherche est de déterminer si les répresseurs traductionnels font partie d'une même voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* nécessaire à l'expression locale d'Ash1. Mon second objectif est d'identifier le mécanisme de recrutement des répresseurs traductionnels sur l'ARNm *ASH1*, qui correspond au point initial des voies de régulations de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Matériels et Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cultures de levures ont été effectuées dans un milieu riche (YPD) ou un milieu de sélection absent de nutriment indiqué, jusqu'à une densité optique (DO 600 nm) d'environ 1 (Rose et al., 1990). Pour obtenir des levures en phase logarithmique comparables, toutes les cultures ont été mises en croissance à deux reprises, ce qui permet d'éviter les écarts de temps de génération entre les différentes souches (Jansen et al., 1996).

2.2. Construction des souches

Les transformations des souches ont été générées selon le protocole de Gietz et Schiestl (Schiestl & Gietz, 1989). Les cassettes de délétion des gènes ont été amplifiées par technique de PCR de la séquence loxP-KAN-loxP du plasmide pUG6 (Güldener et al., 1996) et de la séquence TRP1 du plasmide pFA6aTRP1 (Longtine et al., 1998). Les cassettes des épitopes des marqueurs protéiques ont été amplifiées par technique de PCR de la séquence 13xmyc-TRP du plasmide pFA6a-13xMyc-TRP, de la séquence 13xMyc-KAN du plasmide pFA6a-13xMyc-TRP (Longtine et al., 1998) et de la séquence TAP-TRP du plasmide pBS1479 (Puig et al., 2001). Les souches transformées ont été vérifiées par analyse génomique des séquences à l'aide de la technique de PCR. L'expression des marqueurs protéiques a été validée par immunobuvardage. Une description des souches construites est affichée au Tableau 2.

Tableau 2. Génotypes des souches *S. cerevisiae* utilisées pour cette étude

Souches	Génotypes	Provenance
K4535	<i>MATα HIS3 HO-ADE2 HO-CAN1 URA3::GAL1-10-HO-lacZ</i>	Ralf-Peter Jansen
K4535 <i>khd1</i>	K4535 <i>khd1::TRP1</i>	Cette étude
K4535 <i>puf6</i>	K4535 <i>puf6::KAN</i>	Cette étude
K4535 <i>khd1 puf6</i>	K4535 <i>khd11::TRP1 puf6::KAN</i>	Cette étude
K4822	<i>HO-ADE2 HO-CAN1 she3-1440</i>	Ralf-Peter Jansen
K4822 <i>khd1</i>	K4822 <i>khd1::TRP1</i>	Cette étude
K4822 <i>puf6</i>	K4822 <i>puf6::KAN</i>	Cette étude
K4822 <i>khd1 puf6</i>	K4822 <i>khd1::TRP1 puf6::KAN</i>	Cette étude
K699	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	Ralf-Peter Jansen
K699 <i>khd1</i>	K699 <i>khd1::LoxP</i>	Nicolas Paquin
K699 <i>puf6</i>	K699 <i>puf6::KAN</i>	Cette étude
K699 <i>khd1 puf6</i>	K699 <i>khd1::LoxP puf6::KAN</i>	Cette étude
BY4741	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Open Biosystems
BY4741 <i>PUF6-TAP</i>	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3</i>	Open Biosystems
BY4741 <i>spt4 PUF6-TAP</i>	BY4741 <i>spt4::KAN PUF6-TAP::HIS3</i>	Cette étude
FY119	<i>Mat α his4-912 δ lys2-128 δ leu2Δ1, ura3-52, trp1Δ63</i>	Grant Hartzog
FY119 <i>PUF6-TAP</i>	FY119 <i>PUF6-TAP::TRP1</i>	Cette étude
FY119 <i>spt4</i>	FY119 <i>spt4::KAN</i>	Cette étude *
FY119 <i>PUF6-Myc</i>	FY119 <i>PUF6-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
FY119 <i>LOC1-Myc</i>	FY119 <i>LOC1-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *

FY119 <i>spt4 PUF6-Myc</i>	FY119 <i>spt4::KAN PUF6-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
FY119 <i>spt4 LOCI-Myc</i>	FY119 <i>spt4::KAN LOCI-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
GHY1073	<i>Mat a his4-912 δ lys2-128 δ trp1Δ63, spt5-4</i>	Grant Hartzog
GHY1073 <i>PUF6-TAP</i>	GHY1073 <i>PUF6-TAP::TRP1</i>	Cette étude *
GHY1073 <i>PUF6-Myc</i>	GHY1073 <i>PUF6-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
GHY1073 <i>LOCI-Myc</i>	GHY1073 <i>LOCI-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
	<i>Mat a his4-912δ lys2-12δ leu2Δ1, ura3-52, trp1Δ63</i>	
GHY13	<i>spt5-194</i>	Grant Hartzog
GHY13 <i>PUF6-TAP</i>	GHY13 <i>PUF6-TAP::TRP1</i>	Cette étude *
GHY13 <i>PUF6-Myc</i>	GHY13 <i>PUF6-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
GHY13 <i>LOCI-Myc</i>	GHY13 <i>LOCI-13xMYC::TRP1</i>	Cette étude *
	<i>Mat a his4-912δ lys2-128δ leu2Δ1, ura3-52, trp1Δ63</i>	
GHY611	<i>SPT5-MYC</i>	Grant Hartzog
GHY611 <i>PUF6-TAP</i>	GHY611 <i>PUF6-TAP::TRP1</i>	Cette étude *
		Open
BY4741 <i>SPT4-TAP</i>	BY4741 <i>SPT4-TAP::HIS3</i>	Biosystems
		Open
BY4741 <i>SPT5-TAP</i>	BY4741 <i>SPT5-TAP::HIS3</i>	Biosystems
BY4741 <i>PUF6-Myc</i>	BY4741 <i>PUF6-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>SPT4-TAP</i>		
<i>PUF6-Myc</i>	BY4741 <i>SPT4-TAP::HIS3 PUF6-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>SPT5-TAP</i>		
<i>PUF6-Myc</i>	BY4741 <i>SPT5-TAP::HIS3 PUF6-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>LOCI-Myc</i>	BY4741 <i>LOCI-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>SPT4-TAP</i>		
<i>LOCI-Myc</i>	BY4741 <i>SPT4-TAP::HIS3 LOCI-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>SPT5-TAP</i>		
<i>LOCI-Myc</i>	BY4741 <i>SPT5-TAP::HIS3 LOCI-13xMYC::KAN</i>	Cette étude
BY4741 <i>puf6 LOCI-TAP</i>	BY4741 <i>puf6::KAN LOCI-TAP::HIS3</i>	Cette étude

* Les souches ont été construites pour cette étude mais aucun résultat n'est présenté à partir de celles-ci.

2.3. Construction de plasmides

Les plasmides utilisés pour les essais luciférase contiennent la séquence codante de la luciférase de la luciole provenant du vecteur pGL3 (Promega). La construction des plasmides YCP33-ASH1-1-621-LUC et YCP33-ASH1-1-900-LUC a été produite dans notre laboratoire (Paquin et al., 2007). Le clonage des plasmides YCP33-ASH1-1-621-LUC-E3 et YCP33-ASH1-1-900-LUC-E3 a été effectué par recombinaison homologue d'une séquence correspondant à l'élément de localisation E3 pour permettre la fusion traductionnelle de la séquence du gène *ASH1* (1742-2080) en aval des séquences de la luciférase. La construction de cette séquence a été effectuée par PCR à partir des amorces en 5', ASH1 E3 recomb5 (tcagagagatcctcataaaggccaagaaggcggaagatcgccgtgtaaacataactgagacagtagagaattga) et en 3', ASH1 E3 recomb3 (acacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgcatgctgcagtattagaagcaggtccgc) ainsi que du plasmide C3319 contenant la séquence du gène *ASH1*. La transformation a été effectuée dans les bactéries *E. coli* (DH5 α) et les insertions ont été vérifiées par digestion enzymatique et séquençage.

2.4. Essais génétiques

Les cultures de levures en phase de croissance exponentielle ont été diluées en série selon un facteur de 10. Pour quantifier la croissance cellulaire des souches, 10 μ L de chaque dilution ont été inoculés sur des milieux solides YPD et des milieux de sélections appropriés tels que : sans adénine (-ADE) ou contenant 0,05% de canavanine en absence d'arginine (CAN 0,05%, -ARG). Les géloses ont été incubées à 30°C pour une période d'au moins 3 jours. Les analyses de croissance cellulaire sont représentatives d'au moins 3 essais génétiques.

2.5. Essais Luciférases

Les essais luciférases ont été produits selon la méthode utilisée précédemment dans notre laboratoire (Paquin et al., 2007). Les données brutes des échantillons ont été normalisées sur la concentration totale des protéines obtenue à l'aide de la technique de Bradford. Les résultats des essais luciférases représentent la moyenne d'au moins trois expériences. Les valeurs des activités relatives de la luciférase ont été soumises au test statistique d'analyse de variance unilatérale d'ANOVA avec une comparaison multiple de Newman-Keuls.

2.6. Co-Immunoprécipitation (co-IP)

Les cultures cellulaires ont été resuspendues dans une solution fraîche de lyse non dénaturante (50 mM Tris-HCL, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton 100X, 5%

glycérol, 0,1% BSA, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéase complet sans EDTA (Roche) et 87.5 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride) pour obtenir une DO (600 nm) correspondant à 100. L'extraction des protéines natives a été effectuée à l'aide de billes de verres. Lorsqu'indiqué, 4 unités Kunitz de RNase A (Sigma-Aldrich) ont été ajoutées à la moitié des surnageants et 15 U d'inhibiteurs de RNase (Pharmacia) à l'autre moitié.

2.6.1. Immunoprécipitation (IP)

Les protéines identifiées ont été immunoprécipitées avec les anticorps suivants: anti-Myc 9E10 (Roche), anti-Rpb1 8WG16 (Covance) et anti-IgG de lapins contre l'épitope TAP (Sigma-Aldrich). Les anticorps indiqués ont été ajoutés aux extraits protéiques et incubés avec agitation à 4°C pour une période d'au moins 2 heures. Ensuite, 40 µl de billes de Sépharose A/G ont été ajoutées et l'incubation a été poursuivie avec agitation à 4°C pour une période d'au moins 3 heures. Les billes de Sépharose ont été lavées à 5 reprises avec la solution de lavage (50 mM Tris-HCL, pH 7.6, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton 100X et 5% glycérol). L'élution des protéines a été effectuée en chauffant les billes de Sépharose 10 min à 95°C dans un tampon de charge 2X.

2.6.2. Électrophorèse en gel SDS-PAGE

Les protéines purifiées par immunoprécipitation ont été chargées, ainsi qu'un témoin de masses moléculaires, sur des gels dénaturant SDS-PAGE. Un gel de polyacrylamide à 7,5% ou 10%, selon le poids moléculaire des protéines d'intérêts, est préparé (0,375 M Tris-HCL, pH 8.8, 0,1% SDS, 0,1 % APS, 0,05% TEMED). Un gel de concentration de polyacrylamide à 4% (0,125 M Tris-HCL, pH 6.8, 0,1% SDS, 0,05 % APS, 0,05% TEMED)

est coulé en haut du gel. Les protéines ont été migrées à l'aide d'un courant de 10 à 45 mA pendant environ 1h30 à 3h. À partir du gel d'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose HybondECL (Amersham) par une tension de 15V pendant 45 min. L'efficacité du transfert a été confirmée par coloration au Rouge de Ponceau.

2.6.3. Immunobuvardage (IB)

La détection de protéine liées aux complexes protéiques immunoprécipités a été effectuée par immunobuvardage. Les membranes ont été bloquées de 12 à 16 heures dans une solution PBS-T (0,1% Tween 20) + 5% BSA avec agitation à 4°C. Les anticorps primaires ont été utilisés pour détecter les protéines de liaison d'intérêt en complexe avec les protéines immunoprécipitées. Les anticorps anti-myc 9E10 (Roche), anti-rpb1 8WG16 (Covance) et anti-IgG (Sigma-Aldrich) sont resuspendu 1:1000 dans une solution PBS, tandis que l'anti-pgk1/3-Phosphoglycerate Kinase (Invitrogen/Molecular probes) est resuspendu 1:10 000. Les membranes ont été incubées avec les solutions d'anticorps primaires de 1h30 à 2h à la température de la pièce. Ensuite, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 15 min dans une solution PBS-T avant d'être incubées dans les solutions d'anticorps secondaires, 45 min à 1h à la température de la pièce. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase du raifort (DacoCytomation) ont été dilués 1:8000 dans une solution PBS. Les membranes ont été de nouveau lavées 3 à 5 fois pendant 15 min dans une solution PBS-T avant que le signal soit révélé par le kit ECL (Amersham). Dans le cas où il est nécessaire d'observer une nouvelle protéine sur une même membrane, le signal est effacé à l'aide de la solution de « stripping » (62,5 mM Tris-HCL, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM 2-β-mercaptoéthanol) et le protocole d'IB est reproduit. Les résultats des co-immunoprécipitations sont représentatifs d'au moins 2

expériences.

2.7. Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP)

Les immunoprécipitations de la Chromatine (ChIP) ont été effectuées dans les conditions publiées précédemment (Shen et al., 2010a). Les manipulations ont été exécutées par Zhifa Shen à l'aide des souches de constructions de cette étude, *loc1 PUF6-TAP* et *Puf6 LOC1-TAP*, que j'ai transformées à cet effet. La présence de la séquence analysée de l'élément de localisation E3 a été détectée par amplification à l'aide de la technique de qPCR à partir des amorces en 5', E3-ASH1-for (ttatgctgtaagatccccacaaagggtgaa) et en 3', ASH1-E3-rev (attacaaaataagcaacggtacccttcaat), tandis que la présence de la séquence contrôle a été observée à partir des amorces en 5', ASH1-prom-for (tcgcatcgctagccagcaaaaagt) et en 3', ASH1-pro-rev (caatccacgtaaggaaaatgatcag), ce qui correspond à la séquence du promoteur du gène *ASH1*.

Résultats expérimentaux

3.1. Identification des voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

Selon les études précédentes sur les répresseurs traductionnels de l'ARNm *ASH1*, la présence de deux voies de régulation de la traduction d'Ash1 serait possible. Ces voies de régulations nécessiteraient les éléments de localisation E1 et E3 en *cis* associés à leurs facteurs respectifs, Khd1 et Puf6, en *trans*. Pour déterminer si les voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* agissent de manière additive ou sont redondantes, nous avons effectué des expériences de délétion des gènes codant pour tous les facteurs de répression traductionnelle localisés dans le cytoplasme, soit *KHD1* et *PUF6*. Selon la présence ou l'absence de deux voies de régulation traductionnelle, les phénotypes observés pourraient avoir un effet redondant ou bien additif sur la localisation et l'expression d'Ash1. L'effet de cette régulation traductionnelle d'Ash1 sera évalué à l'aide de la technique d'essais génétiques basée sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1 et de la technique de gènes rapporteurs luciférases.

3.1.1. Les essais génétiques ne démontrent aucun effet additif de Khd1 et Puf6 sur la régulation de *ASH1*

La technique d'essais génétiques basée sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1 a été développée par l'équipe de Kim Nasmyth (Jansen et al., 1996). Cette technique de génétique inverse permet d'identifier les facteurs ayant une influence sur la localisation de l'ARNm *ASH1* et d'Ash1 par l'observation des phénotypes de croissance associés à la perte de

la DCA. Localisée dans le noyau, la protéine Ash1 permet notamment la répression transcriptionnelle du gène *HO* en se fixant sur son promoteur. Ainsi, en insérant le promoteur *HO* en amont de gènes marqueurs tel que *ADE2* et *CAN1*, la modulation de l'expression de ces deux gènes de sélection est effectuée selon la distribution nucléaire d'Ash1. Dans les souches sauvages, la DCA est produite grâce à la séquestration d'Ash1 dans le noyau de la cellule-fille exclusivement. Tandis que dans les souches ayant un défaut dans la localisation d'Ash1, l'expression des gènes de sélection sera inhibée dans les deux cellules en division et leur niveau d'expression sera pratiquement nul. Ainsi, les gènes *ADE2* et *CAN1* ont été fusionnés au promoteur *HO* pour créer les gènes régulateurs hybrides *HO-ADE2* et *HO-CAN1*, par la suite intégrés au génome des levures *S. cerevisiae* (Jansen et al., 1996) (**Figure 11A**).

L'expression du gène *ADE2* permet la production de la phosphoribosylaminoimidazole carboxylase. Cet enzyme est essentiel à la biogenèse de *nov*o des purines chez les levures, lorsque le milieu ne contient pas d'adénine (Dorfman, 1969). Soumis à un environnement où la quantité d'adénine est nulle, seules les levures sauvages ayant une distribution asymétrique d'Ash1 auront la capacité de survivre. Le gène *CAN1* code pour une protéine membranaire, l'arginine perméase, qui permet l'introduction de l'arginine environnante dans les levures. Toutefois, cette perméabilité membranaire confère aussi une sensibilité à la canavanine, un homologue toxique de l'arginine. L'expression de *CAN1* sera létale pour les levures sauvages exposées à un milieu de sélection contenant de la canavanine. Ainsi, le phénotype de croissance des levures témoigne de la distribution d'Ash1 dans les noyaux selon les milieux de sélection utilisés (**Figure 11B**).

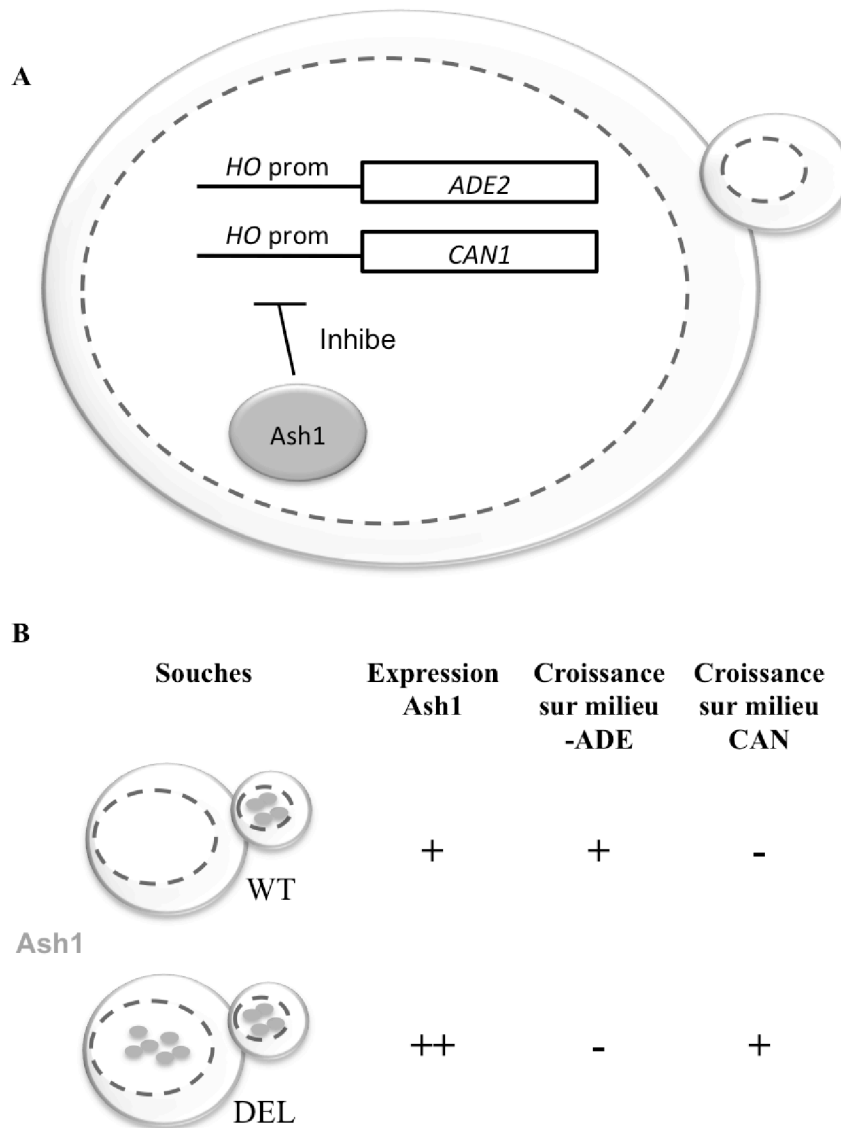


Figure 11. Description des essais de génétiques inverses basés sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1. (A) Schéma du génome des levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées pour les essais génétiques basés sur la localisation de la protéine Ash1 (Jansen et al., 1996). Les séquences codantes *ADE2* et *CAN1* fusionnées au promoteur du gène *HO* sont intégrées dans le génome des levures. La protéine Ash1 inhibe la transcription de ces gènes en s'associant au promoteur *HO* lorsqu'elle est présente dans le noyau. Le gène *ADE2* est nécessaire à la biogenèse de *novo* des purine, alors que le gène *CAN1* confère une sensibilité à la canavanine, un homologue toxique de l'arginine. (B) Tableau de croissance

des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* employées pour les essais génétiques basés sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1. Les souches sauvages (WT) présentent une distribution asymétrique normale de la protéine Ash1, qui est localisée uniquement dans le noyau de la cellule-fille. Les souches de délétion provoquant la délocalisation de la protéine Ash1 (DEL) entraînent la présence d'Ash1 dans les deux noyaux. La localisation d'Ash1 dans le noyau bloque l'expression des gènes *ADE2* et *CAN1* de façon modérée (+) auprès des souches WT et de manière élevée (++) dans les souches DEL. La transcription du gène *ADE2* permet la survie des cellules-mères des levures WT sur les milieux de sélection sans adénine (-ADE), alors que l'expression du gène *CAN1* provoque la mort des cellules-mères des souches WT incubées sur un milieu de sélection composé de canavanine (CAN). À l'opposé, l'expression des gènes *ADE2* et *CAN1* dans les souches DEL est complètement bloquée par la présence d'Ash1 dans les deux noyaux, ce qui provoque les phénotypes inverses dans les deux milieux de sélections.

Pour établir le nombre de voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* à partir des facteurs de répression traductionnelle cytoplasmiques, nous avons effectué la délétion des gènes codants pour Khd1 et Puf6 dans les souches contenant les gènes marqueurs *HO-ADE2* et *HO-CAN1*. Toutefois, il a été précédemment établi que la souche *khd1* ne présente pas un phénotype suffisamment prononcé pour être observé à l'aide des essais génétiques sur le milieu de culture sans adénine (Irie et al., 2002). Néanmoins, l'utilisation de souches de délétion des gènes *SHE3* ou *MYO4* exacerbe le phénotype de la souche *khd1*, permettant alors l'analyse de l'influence de Khd1 sur la DCA (Irie et al., 2002). Ainsi, les souches de délétion *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1* ont été construites à partir de la souche sauvage et de la souche de délétion du gène *SHE3*, *she3-1440* (Jansen et al., 1996). Pour permettre l'analyse de la distribution asymétrique d'Ash1, les souches de levure ont été exposées à deux

milieux de sélection, l'un sans adénine (-ADE) et l'autre contenant l'homologue toxique de l'arginine, la canavanine (CAN 0,05%, -ARG). L'absence d'arginine (-ARG) sur le milieu contenant la canavanine permet d'éviter le bruit de fond expérimental, c'est-à-dire la croissance de levure exprimant le gène *CAN1* en utilisant l'arginine au lieu de la canavanine.

Sur le milieu de sélection –ADE, le phénotype de croissance des souches de délétions inoculées est similaire à leur souche d'origine respective (**Figure 12A**). En effet, la souche sauvage présente le même phénotype de survie cellulaire que les souches *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1*. Ces résultats confirment que la fonction de répression traductionnelle de Khd1 n'est pas observable dans ces conditions (Irie et al., 2002). Ayant un mécanisme de régulation similaire à Khd1, il était attendu que l'influence de Puf6 sur la localisation de l'ARNm *ASH1* ne serait pas apparente dans ces mêmes conditions. Toutefois, l'absence des deux facteurs de régulation de la traduction Khd1 et Puf6 ne semble pas amplifier la délocalisation d'Ash1 qui aurait pu être observée par un retard de croissance des souches *puf6 khd1*. Inversement, toutes les souches contenant la délétion du gène *SHE3* démontrent un phénotype sévère de mort cellulaire. Malheureusement, le phénotype de la souche *she3-1440* est trop prononcé pour permettre l'analyse de l'influence des délétions *KHD1* et *PUF6*, contrairement au phénotype des souches *myo4-910 khd1* (YKEN254), publié précédemment (Irie et al., 2002). D'après les résultats de cet essai génétique, l'absence des facteurs de répression de la traduction Khd1 et Puf6 n'influencerait pas la distribution cellulaire de la protéine Ash1.

Sur le milieu de croissance CAN 0,05%, -ARG, la croissance des souches sauvages semble de moitié moindre comparativement aux souches *she3-1440* (**Figure 12B**). Ce résultat est prévisible, puisque la distribution asymétrique de la protéine Ash1 permet l'incorporation

de la canavanine auprès d'une levure sauvage sur deux. Toutefois, le phénotype des souches de délétion est majoritairement similaire à celui de leur souche d'origine respective. Seules les souches *puf6* et *she3-1440 khd1* démontrent une croissance légèrement réduite, comparativement à leur souche de transformation initiale respective. Néanmoins, ces deux souches de délétions ne correspondent pas au même facteur de répression traductionnelle. Ainsi, ces résultats ne permettent pas de tirer de conclusion.

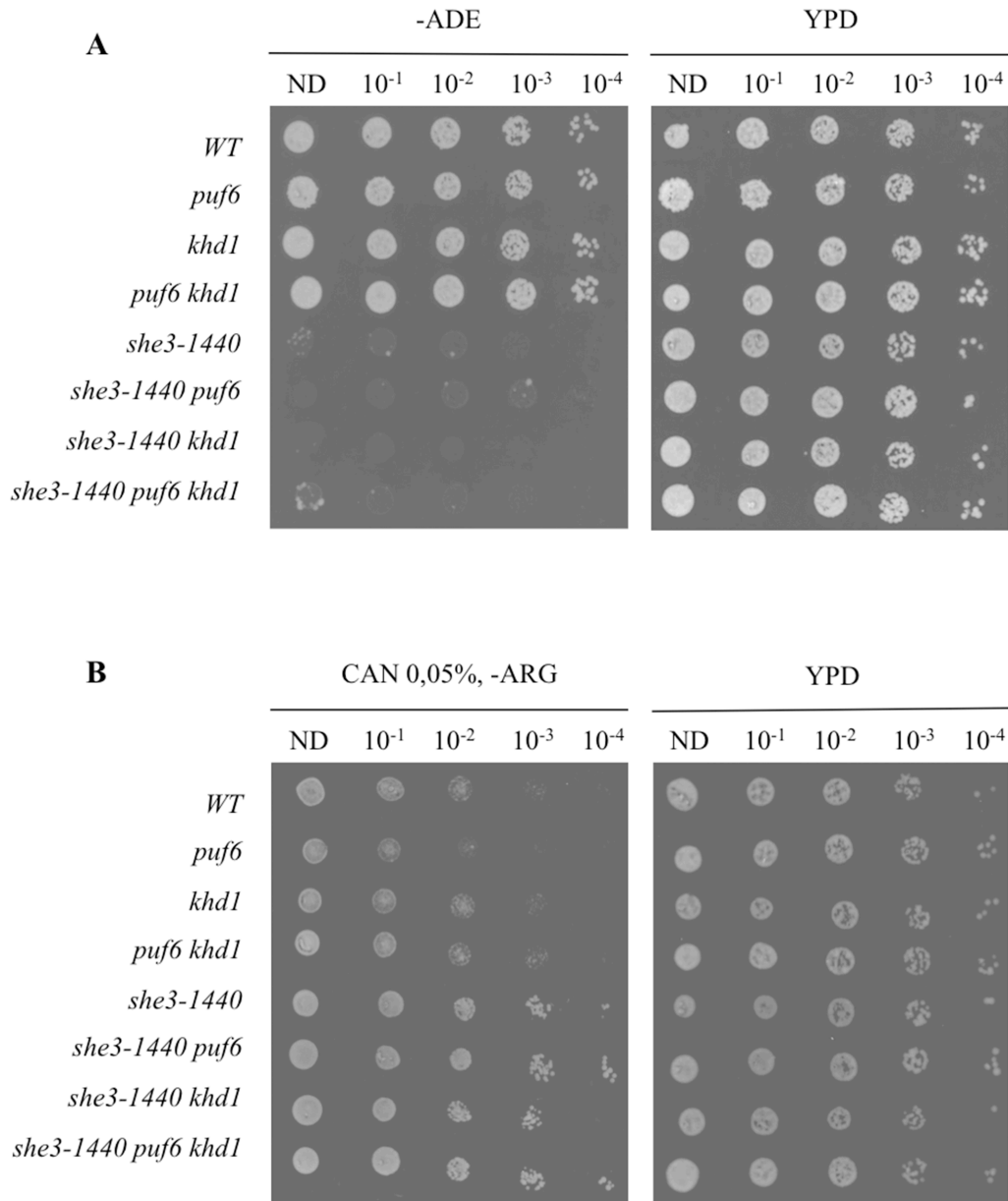


Figure 12. Essais génétiques basés sur la distribution asymétrique de la protéine Ash1.

(A) Analyse de croissance des levures selon l'expression du gène *HO-ADE2*, dans les souches sauvages K4535 (*WT*), *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1* et dans les souches K4822 (*she3-1440*), *she3-1440 puf6*, *she3-1440 khd1* et *she3-1440 puf6 khd1*, inoculées avec un facteur de dilution de 10 sur un milieu nutritif riche (YPD) et un milieu de sélection en absence d'adénine (-ADE).

(B) Analyse de croissance des levures selon l'expression du gène *HO-CAN1*, dans les souches

sauvages K4535 (WT), *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1* et dans les souches *she3-1440*, *she3-1440 puf6*, *she3-1440 khd1* et *she3-1440 puf6 khd1*, inoculées avec un facteur de dilution de 10 sur un milieu nutritif riche (YPD) et un milieu de sélection en présence de 0,05% de canavanine et en absence d'arginine (CAN 0,05%, -ARG).

De manière générale, les essais génétiques effectués ne démontrent pas un effet additif des facteurs Khd1 et Puf6 sur la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* et la distribution de Ash1. Pour ce faire, il serait primordial d'observer la fonction connue de répression traductionnelle sur l'ARNm *ASH1* des facteurs Khd1 et Puf6. Ainsi, une technique permettant la quantification du niveau d'expression de la protéine Ash1 a par la suite été employée, soit la technique de gènes rapporteurs luciféras.

3.1.2. Les essais luciférases suggèrent l'existence d'une seule voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

Étant donné les résultats non concluants obtenus à partir des essais génétiques effectués précédemment, la technique de gènes rapporteurs luciférases a été utilisée. Cette technique plus fiable possède une capacité de détection plus directe et plus sensible du niveau d'expression de la protéine Ash1. Ainsi, les essais luciférases devraient permettre d'établir la présence de voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Le système rapporteur utilisé est basé sur l'expression de protéines bioluminescentes luciférases. Ces protéines bioluminescentes produisent de la lumière froide, ce qui permet leur observation. Les enzymes luciférases de la luciole catalysent l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière, qui est détectée à une longueur d'onde de 562nm (**Figure 13**). Lorsque le substrat et les cofacteurs ajoutés ne sont pas des composantes limitantes de la réaction chimique, l'intensité de l'émission de lumière est proportionnelle à l'activité luciférase. Ainsi, dans des conditions expérimentales optimales, l'intensité de la lumière est représentative du niveau d'expression des luciférases.

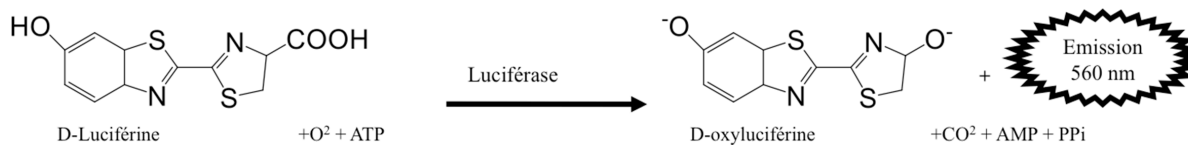


Figure 13. Réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase de la luciole. En présence du substrat D-luciférine et de cofacteurs d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 , les enzymes luciférases de la luciole catalysent l'oxydation de la D-luciférine pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière (562 nm).

Pour produire les essais luciférases, le vecteur contenant le gène rapporteur de la luciférase de la luciole (*FLUC*) est placé sous le contrôle des éléments de régulation analysés. Suite à l'introduction du plasmide dans un modèle cible, les facteurs de régulation de la transcription et de la traduction permettent l'expression des protéines luciférases. Les protéines sont ensuite extraites et le niveau de luciférase est quantifié selon son activité enzymatique suite à l'ajout des cofacteurs nécessaires. Ainsi, la détection de l'expression de la protéine de fusion luciférase correspond à l'intensité de lumière émise par les échantillons. Le niveau d'expression de la luciférase est alors représentatif de l'influence des éléments de régulations en *cis* fusionnés à celle-ci et des protéines régulatrices en *trans* qui s'y lient.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* est effectuée par la liaison de facteurs Khd1 et Puf6 en *trans* sur les éléments de localisation E1 et E3 en *cis* de l'ARNm *ASH1*, respectivement. L'influence singulière ou combinée des facteurs cytoplasmiques Khd1 et Puf6 a été examinée à l'aide de la technique de gène rapporteur

FLUC pour déterminer les voies de régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1*. Pour effectuer ces essais luciférase, plusieurs plasmides rapporteurs contenant les séquences du gène *ASH1* correspondant aux éléments de localisation E1 et E3 ont été introduits dans les levures de délétion *khd1*, *puf6*, *khd1 puf6* (**Figure 14**).

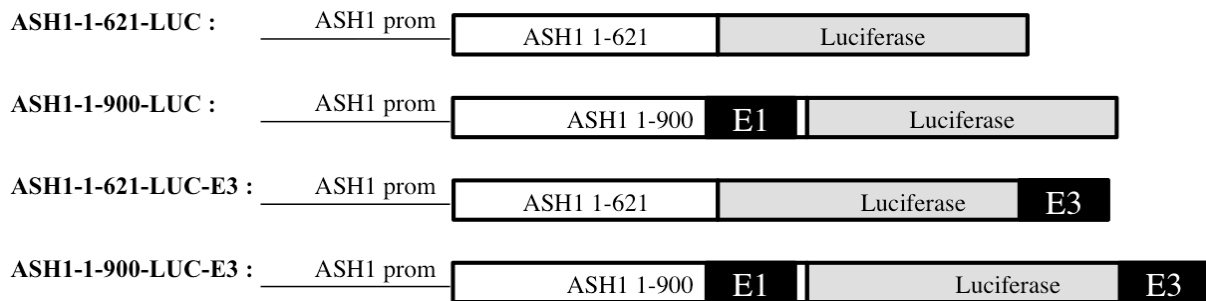


Figure 14. Schéma des plasmides utilisés pour les essais luciférase. Tous les plasmides contiennent le promoteur endogène du gène *ASH1* et les numéros correspondent à ceux de la séquence codante de l'ARNm *ASH1*. Le plasmide ASH1-1-621-LUC ne contient aucun élément de localisation. Le plasmide ASH1-1-900-LUC contient l'élément de localisation E1. Le plasmide ASH1-1-621-LUC-E3 contient l'élément de localisation E3. Le plasmide ASH1-1-900-LUC-E3 contient l'élément de localisation E1 et E3.

Tel qu'attendu, l'expression d'Ash1-1-621-Luc est similaire dans toutes les souches en l'absence des éléments de localisations E1 et E3 (**Figure 15A**), confirmant la nécessité de ces éléments au niveau de la régulation de l'expression de la protéine Ash1. Lorsque seul l'élément de localisation E1 est ajouté au vecteur rapporteur (**Figure 15B**), l'activité luciférase de la protéine rapporteuse Ash1-Luc augmente dans les souches *khd1*, confirmant

le rôle de répresseur traductionnel de Khd1, tel que démontré précédemment par des essais luciférasés exécutés dans notre laboratoire (Paquin et al., 2007). De plus, aucune différence significative n'est observée dans les souches *puf6* comparativement aux souches sauvages, puisque l'élément de localisation E1 n'est pas connu comme étant un site de liaison de la protéine Puf6. Néanmoins, l'activité luciférase est amplifiée dans les souches *khd1 puf6*. Ces résultats démontrent que Puf6 accentue le rôle de répression traductionnel de Khd1 sur l'élément de localisation E1 de l'ARNm *ASH1*.

Par ailleurs, l'expression d'Ash1-Luc en présence de l'élément de localisation E3 exclusivement (**Figure 15C**) est augmentée dans la souche *puf6* mais pas dans la souche *khd1*, comparativement à celle des souches sauvages. Ceci illustre le mécanisme de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* par la protéine Puf6, qui nécessite la présence de l'élément E3 (Gu et al., 2004). Cependant, l'activité luciférase obtenue dans les souches *khd1 puf6* est similaire au niveau d'expression des souches *puf6*. Ces résultats indiquent que l'absence de Khd1 ne semble pas avoir d'influence auprès de la voie de régulation de Puf6, contrairement à l'absence de Puf6 auprès de la voie de régulation de Khd1 (**Figure 15B**).

Finalement, lorsque les éléments de localisation E1 et E3 sont tous deux présents (**Figure 15D**), le niveau d'expression d'Ash1-Luc est augmenté uniquement dans les souches *khd1 puf6*. Ces résultats indiquent qu'en présence des éléments E1 et E3, les protéines Khd1 et Puf6 peuvent compléter l'activité de l'une en absence de l'autre pour réprimer la traduction d'*ASH1*. Ainsi, on peut conclure que Khd1 et Puf6 ont des activités redondantes et font partie d'une même voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

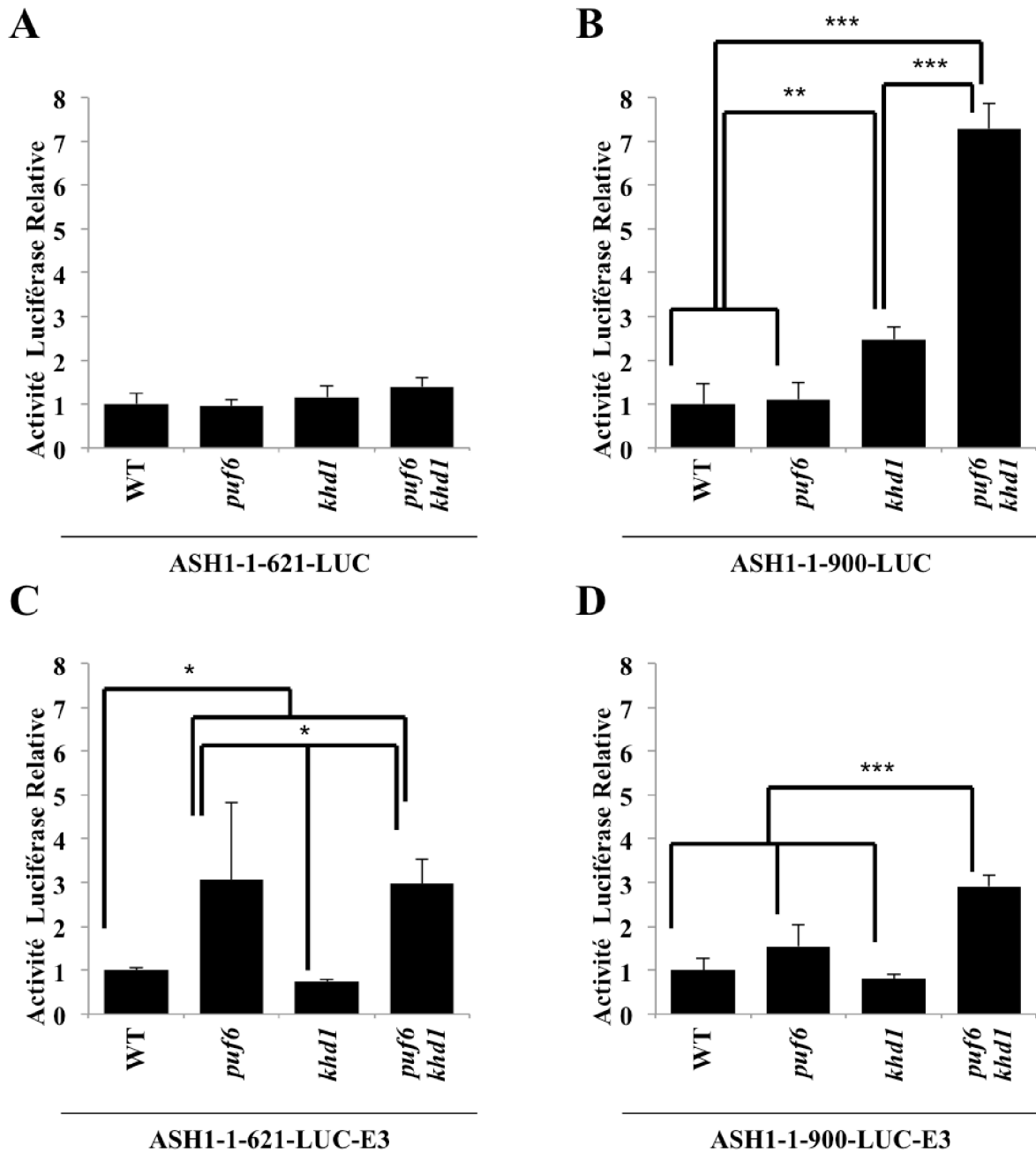


Figure 15. L'activité relative des protéines de fusion luciférase par rapport à la souche sauvage (WT) est observée dans les souches *puf6*, *khd1* et *puf6 khd1*. L'activité de la luciférase est normalisée sur la concentration de protéine totale de chaque échantillon. Les niveaux d'activité luciférase ainsi obtenus représentent l'expression des plasmides (A) ASH1-1-621-LUC, (B) ASH1-1-900-LUC, (C) ASH1-1-621-LUC-E3, (D) ASH1-1-900-LUC-E3. * $p < 0,05$. ** $p < 0,001$. *** $p < 0,0001$. Les barres d'erreurs indiquent la déviation standard d'au moins trois essais.

3.2. Recrutement co-transcriptionnel des facteurs de régulations de la traduction de l'ARNm *ASH1*

La présence d'une seule voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*, démontrée à partir des essais luciférases, implique que le recrutement des répresseurs traductionnels sur l'ARNm pourrait correspondre au point initial de cette voie de régulation. Pour mieux connaître le mécanisme de recrutement des répresseurs traductionnels sur l'ARNm *ASH1*, leur interaction avec la machinerie de transcription a été évaluée à l'aide de la technique de co-immunoprécipitation (co-IP), tandis que leur recrutement sur la séquence *ASH1* a été observé grâce à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Puisque plusieurs données sont disponibles dans la littérature concernant les facteurs de répression Puf6, celui-ci a constitué le premier facteur d'intérêt pour les expériences préliminaires. Par la suite, la protéine Loc1 a été considérée puisqu'elle est localisée strictement au noyau et interagit avec Puf6. Toutefois, le mécanisme de recrutement de Khd1 n'a pas pu être évalué par contrainte de temps.

3.2.1. Les expériences de co-IP confirment l'interaction entre la machinerie de transcription et Puf6 ainsi que Loc1

Le mécanisme du recrutement des facteurs de répression traductionnelle, Puf6 et Loc1, pourrait avoir lieu dans le noyau, directement sur la machinerie de transcription en phase d'élongation. En effet, ces facteurs ont été repérés par spectrométrie de masse, sur le complexe de la transcription en élongation co-immunoprécipité avec le facteur Spt5-FLAG

(Lindstrom et al., 2003). Toutefois, nombre de facteurs ont été présentés dans cette recherche et l'interaction entre Puf6, Loc1 et le complexe Pol II n'a pas été confirmée par de nouvelles études. D'ailleurs, en ce qui concerne la liaison de Loc1, les auteurs mentionnent la probabilité d'un artefact (Lindstrom et al., 2003). Pour valider la présence de Puf6 et Loc1 sur la machinerie de transcription, nous avons effectué de nouvelles co-IP. Toutefois, la détection des facteurs spécifiques co-immunoprécipités est évaluée spécifiquement par immunobuvardage (IB).

De manière générale, la méthode de co-IP est une technique qui est employée pour l'observation des interactions entre diverses protéines au sein d'un même complexe cellulaire. La purification d'une protéine d'intérêt avec son complexe cellulaire natif est obtenue par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique. Les facteurs faisant partie de ce complexe, dit « co-immunoprécipités », sont détectés. Suite à leur détection, la technique de co-IP permet d'établir l'interaction de facteurs avec la protéine immunoprécipitée. De plus, pour déterminer si l'interaction entre ces protéines est dépendante de la présence des ARN du complexe, les ARN ont été préalablement dégradés dans les lysats cellulaires par un traitement de RNase, lorsqu'indiqués

Pour évaluer la présence d'interaction entre Puf6 et la machinerie de transcription, un épitope TAP a été fusionné à l'extrémité C-terminal de la séquence codante de *PUF6* dans plusieurs souches de levures ayant des mutations au niveau des facteurs d'élongation Spt4 et Spt5 (**Tableau 2**). De cette manière, il a été possible d'immunoprécipiter la protéine Puf6-TAP à l'aide d'un anticorps contre les IgG et d'identifier la présence de l'ARN polymérase II natif dans le complexe immunoprécipité par immunoblot (IB), en utilisant l'anticorps

spécifique 8WG16 contre la sous-unité Rbp1. Il est à noter que dans ces conditions, l'utilisation de l'épitope TAP ne permet pas la co-IP inverse, c'est-à-dire l'IP de Rbp1 et la détection de TAP par IB puisque l'utilisation des IgG lors de la détection produirait plusieurs artéfacts en reconnaissant tous les anticorps utilisés durant l'IP. De plus, la détection par IB de la protéine constitutive Pgk1 est un contrôle expérimental qui permet l'estimation de la quantité totale de protéine dans chaque lysat cellulaire et l'évaluation de l'efficacité de l'immunoprécipitation. Dans ces conditions, l'interaction entre Puf6-TAP et Rbp1 sera observée, mais abolie dans les souches de mutations disponibles, correspondant à la délétion du facteur Spt4 et au facteur Spt5 thermosensible.

Les résultats montrent que Rbp1 est co-immunoprécipitée dans les extraits de levures exprimant Puf6-TAP ou non, tandis que la délétion de *SPT4* provoque une perte de la détection de Rbp1 (**Figure 16A**). Toutefois, il est difficile de conclure que Puf6-TAP interagit avec Rbp1 puisque la protéine Rbp1 est détectée dans le contrôle négatif, c'est-à-dire lors des IP produites dans les souches sauvages n'exprimant pas la protéine marquée, Puf6-TAP. De plus, la fraction de lysat (INPUT) utilisée n'est pas suffisante pour permettre la visualisation de Rbp1 dans toutes les souches avant l'IP. Toutefois, la faible présence du contrôle Pgk1 est similaire dans les INPUT et disparaît, comme attendu, à la suite des purifications effectuées par IP. Néanmoins, cette expérience fut reproduite dans diverses souches BY4741 contenant des mutations thermosensibles du facteur Spt5 (**Tableau 2**) et Rbp1 est détectée suite aux IP produites dans toutes ces souches en absence de Puf6-TAP (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent une interaction non-spécifique de Rbp1 avec les billes de Sépharose ou avec l'anticorps.

Pour tenter de comprendre le signal obtenu dans les contrôles négatifs des co-IP, de nouveaux contrôles ont été ajoutés (**Figure 16B**). Pour bloquer les interactions non spécifiques des billes de Sépharose avec d'autres protéines que les anticorps IgG utilisés, un pré-traitement avec des protéines d'albumine sérique bovine (BSA) a été ajouté aux billes de Sépharose. Malheureusement, cette manipulation supplémentaire ne semble pas modifier le signal de Rpb1 en l'absence de *PUF6-TAP*. D'ailleurs, Rpb1 n'est pas observé dans les extraits en absence d'anticorps IgG nécessaire à l'IP, tel qu'établi précédemment (Shen et al., 2010a). Ce contrôle utilisé antérieurement permet de déterminer que les billes de Sépharose ne sont pas suffisantes pour permettre l'IP de Rpb1 et que celles-ci se lient de manière spécifique aux anticorps. De plus, les auteurs ont présenté un contrôle négatif de l'anticorps 8WG16 en présence des anticorps myc dans les extraits des souches sauvages de provenance W303 (Shen et al., 2010a). Ce contrôle fut reproduit en présence des anticorps IgG. Cependant, la protéine Pgc1 est toujours présente dans l'immunoprécipitat, ce qui suggère que l'efficacité de cette IP est moindre. Néanmoins, Rpb1 n'est pas détectée dans les souches sauvages W303, comparativement aux souches sauvages BY4741 (**Figure 16C**). Ainsi, ces nouvelles expériences avec de nombreux contrôles ne permettent pas de comprendre l'immunoprécipitation de Rpb1 dans les contrôles négatifs utilisés, soit les souches sauvages BY4741.

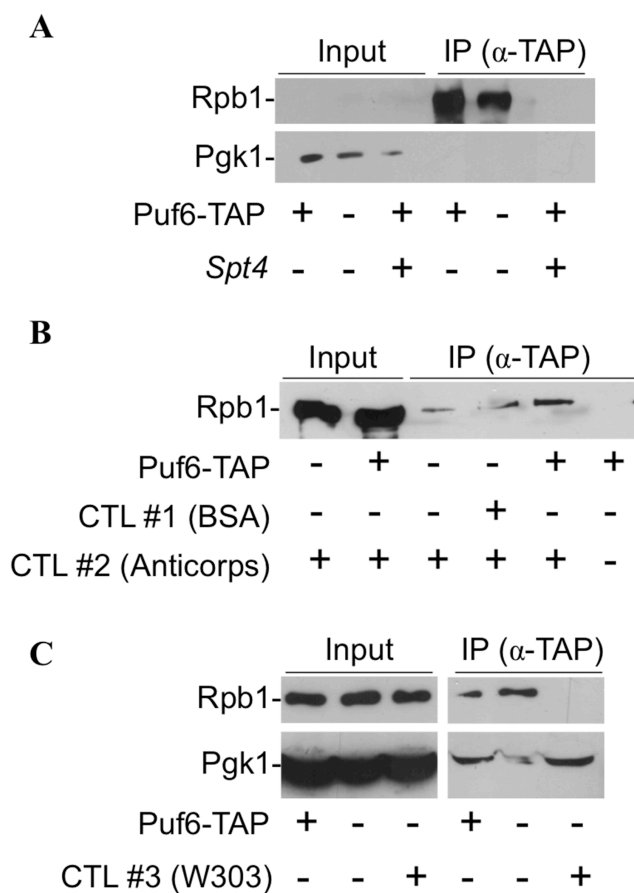


Figure 16. Co-IP entre Puf6-TAP et la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II. Immunoprécipitation (IP) de Puf6-TAP avec l'anticorps spécifique au IgG de souris (α -TAP) et détection par immunobuvardage (IB) de Rpb1 à l'aide d'un anticorps spécifique au complexe de l'ARN polymérase II, α -Rpb1 (8WG16) et de la protéine constitutive Pgk1 avec l'anticorps respectif, α -Pgk1. Une fraction de 3% à 5% des lysats cellulaires (INPUT) et une fraction de 30% à 45% de l'IP sont présentées. Cette co-IP a été effectuée dans trois essais en présence de contrôles différents. (A) La présentation du résultat dans les souches BY4741 sauvages, *PUF6-TAP* et *PUF6-TAP spt4*. (B) Le contrôle 1 (CTL #1) représente l'utilisation des billes Sépharose couplées aux protéines A préalablement bloquées avec de la BSA pour réduire le signal de bruit de fond. Le contrôle 2 (CTL #2) est la co-IP produite en absence d'anticorps, α -TAP. (C) Le contrôle 3 (CTL #3) est la reproduction de la co-IP à partir des souches sauvages W303 comparativement aux souches sauvages BY4741 utilisées.

Compte tenu des problèmes de spécificité dans les souches BY4741 mis en évidence avec l'épitope TAP, celui-ci a été remplacé par l'intégration d'un nouvel épitope, myc (**Tableau 2**). D'ailleurs, l'épitope myc fait partie des conditions expérimentales de co-IP qui ont permis d'établir l'interaction entre She2-myc et Rpb1 dans les souches W303 (Shen et al., 2010a). Ainsi, l'on suppose que l'origine génétique de la souche BY4741, soit S288C, qui est différente de W303, n'est pas suffisante pour expliquer l'immunoprécipitation de Rpb1 dans les contrôles négatifs. Par ailleurs, de multiples souches mutantes et thermosensibles de la machinerie de transcription sont disponibles à partir des souches S288C, comparativement aux souches W303. De plus, l'épitope myc permet de générer des co-IP inverses, c'est-à-dire d'effectuer l'immunoprécipitation de Rpb1 et d'observer l'interaction avec les répresseurs traductionnels Puf6 ou Loc1 en détectant ceux-ci par IB.

Malheureusement, les co-IP effectuées auprès de plusieurs souches de provenances S288C présentent toujours un signal de Rpb1 en absence de Puf6-myc (**Figure 17A**). Il était attendu que la plus grande spécificité de l'anticorps contre l'épitope myc aurait dû permettre l'établissement d'un contrôle négatif fiable. Pour confirmer l'absence de Puf6-myc lors de l'observation de Rpb1, Puf6-myc a été détectée par IB dans les souches sauvages BY4741 et *PUF6-MYC* (**Figure 17B**). Ainsi, l'efficacité de l'enrichissement de Puf6-myc par IP peut être appréciée, mais ne fournit pas d'explication du signal Rpb1 obtenue dans le contrôle négatif (*PUF6* sans myc). Par contre, en effectuant une co-IP inverse (immunoprécipitation de Rpb1, immunoblot sur Puf6-myc), Rpb1 n'est pas détectée dans les souches sauvages et l'absence de Puf6-myc correspond au contrôle négatif (**Figure 18**). Toutefois, la fiabilité de ce contrôle négatif est discutable puisque l'absence de signal contre la protéine Puf6-myc est représentative de son niveau d'expression, qui est nul, dans les souches sauvages. Pour

valider la co-IP inverse, des anticorps IgG non spécifiques à la protéine Rpb1 ont été utilisés comme contrôle négatif pour effectuer un IP, en parallèle, dans les souches *PUF6-MYC*. Nous observons toujours une bande correspondant à Puf6-myc après immunoprécipitation avec les anticorps IgG non spécifiques. Comme les contrôles négatifs ne sont pas négatifs, les résultats de cette co-IP inverse sont interprétés comme invalides. Ainsi, nous avons de la difficulté à obtenir un contrôle négatif fiable lors de l'utilisation de l'anticorps 8WG16 dans les souches utilisées.

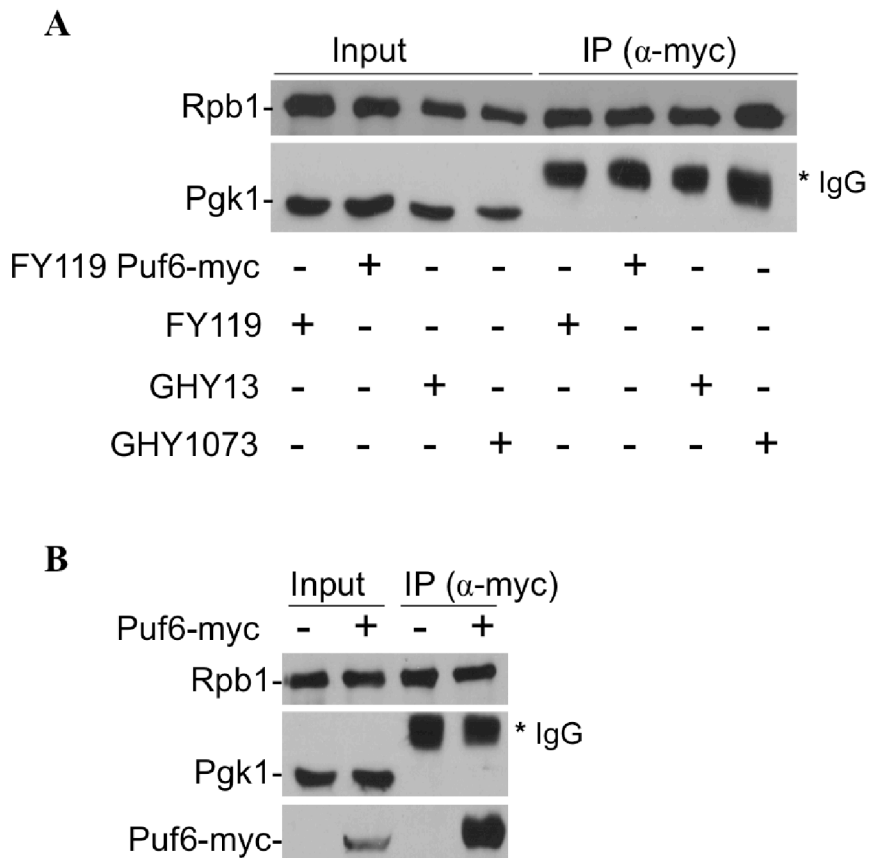


Figure 17. Co-IP entre Puf6-myc et la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II. L'immunoprécipitation (IP) de Puf6-myc est effectuée avec l'anticorps spécifique à l'épitope myc, α -myc (9E10). Une fraction de 3% à 5% des lysats cellulaires (INPUT) et une fraction

de 30% à 45% de l'IP sont présentées. La détection par immunobuvardage (IB) de Rpb1 à l'aide des anticorps 8WG16 (α -Rpb1) et de la protéine constitutive Pgk1 (α -Pgk1) été effectué dans (A) plusieurs souches de provenance S288C, contenant des mutants thermosensibles de Spt4 /5, soit GHY13 et GHY1073, ainsi que la souche sauvage FY119 et avec l'insertion de l'épitope myc dans Puf6 (FY119 *PUF6-MYC*). (B) La détection par IB de la protéine Puf6p-myc avec l'anticorps α -myc a été ajoutée comme contrôle d'observation de l'efficacité de l'IP dans les souches BY4741 sauvages et les souches *PUF6-MYC*. L'astérisque (*IgG) représente un artéfact de la détection de la chaîne lourde des anticorps de souris IP (α -myc) détectés par l'anticorps de souris utilisé pour détecter Pgk1.

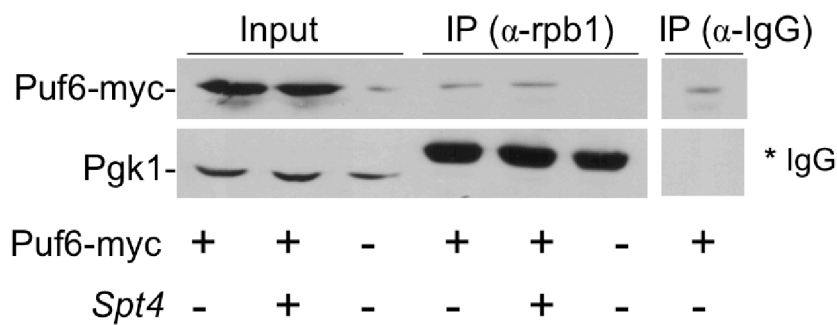


Figure 18. Co-IP inverse entre Puf6-myc et la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II. L'immunoprécipitation (IP) inverse de Rpb1 à l'aide de l'anticorps spécifique 8WG16 (α -Rpb1) a été effectuée ainsi qu'une IP contrôle avec les anticorps non-spécifique IgG (α -IgG). Une fraction de 3% à 5% des lysats cellulaires (INPUT) et une fraction de 30% à 45% de l'IP sont présentées. La détection par immunobuvardage (IB) de Puf6p-myc avec l'anticorps spécifique à l'épitope myc (α -myc) et de la protéine constitutive Pgk1 (α -Pgk1) a été effectuée dans les souches BY4741 sauvages, *PUF6-MYC* et *PUF6-MYC spt4*. L'astérisque (*IgG) représente un artéfact de la détection de la chaîne lourde des anticorps de souris de l'IP (α -Rpb1) détectés par l'anticorps de souris utilisé pour l'observation de Pgk1.

Pour éviter l'emploi d'anticorps spécifiques pour l'ARN polymérase II, les souches de provenance S288C contenant le dimère de régulation de la transcription Spt4/5 fusionné avec l'épitope TAP ont été employées. Ainsi, les facteurs Spt4-TAP et Spt5-TAP ont été immunoprécipités à partir d'extraits cellulaires de souches exprimant Puf6-myc. Puf6-myc et Pkg1 sont présentes dans tous les INPUT. Suite à l'enrichissement par IP, les protéines non spécifiques au complexe sont lavées et l'efficacité de l'immunoprécipitation est représentée par la disparition du signal de détection de Pkg1. Les résultats démontrent la présence de Puf6-myc par IB dans le complexe immunoprécipité de Spt4-TAP et Spt5-TAP seulement (**Figure 19**). Dans les souches où Spt4 et Spt5 ne sont pas fusionnées avec l'épitope TAP, Puf6-myc n'est pas détectée par IB suite à l'IP. De plus, Puf6-myc n'est plus détecté lorsqu'un traitement à la RNase est ajouté aux lysats cellulaires. De cette manière, il est démontré que Puf6-myc interagit avec les protéines de fusion Spt4-TAP et Spt5-TAP en présence d'ARN.

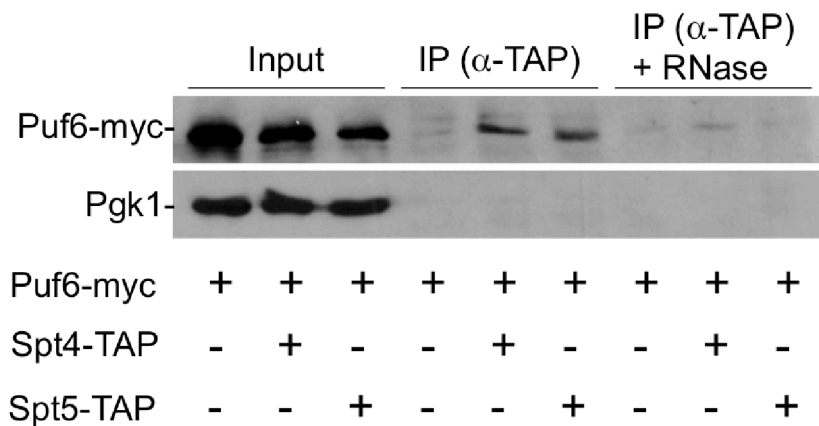


Figure 19. Interaction ARN-dépendant entre le dimère de régulation de la transcription Spt4/Spt5 et Puf6. Immunoprécipitation (IP) de Spt4-TAP et Spt5-TAP avec l'anticorps spécifique à l'épitope TAP (α -TAP). Une fraction de 3% à 5% des lysats cellulaires (INPUT) est présentée et un traitement RNase a été effectué sur la moitié des lysats. Le résultat de l'IP est présenté en entiereté. La détection par immunobuvardage (IB) de Puf6p-myc avec l'anticorps spécifique à l'épitope myc (α -myc) et de la protéine constitutive Pgk1 (α -Pgk1) a été effectué dans les souches *PUF6-MYC*, *PUF6-MYC SPT4-TAP* et *PUF6-MYC SPT5-TAP*. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences. Publié dans les données supplémentaires de l'article « Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization » du journal *Nucleic Acids Research* (Shahbadian et al., 2014), présenté en annexe 2.

L'interaction entre le répresseur traductionnel Loc1 et le dimère de régulation de la transcription Spt4-Spt5 a été testé dans les mêmes conditions (**Figure 20**). En effet, Loc1-myc est détecté lorsque les protéines Spt4-TAP et Spt5-TAP sont immunoprécipitées. En absence des protéines de fusions TAP lors de l'IP de la souche *LOC1-MYC*, Loc1-myc est détecté

faiblement et le signal est comparable à la souche BY4741 sauvage. La présence notamment de ces contrôles négatifs fiables permet de conclure que Loc1-myc fait partie du complexe de régulation de transcription en présence de Spt4-TAP et Spt5-TAP, tel que Puf6. Malheureusement, par manque de temps, le traitement à la RNase n'a pu être effectué dans cette dernière co-IP pour évaluer l'influence des ARN dans la liaison entre le dimère Spt4-Spt5 et Loc1. Les expériences d'interaction concernant le facteur de régulation traductionnel Khd1 ont aussi été reportées pour prioriser l'investigation des protéines Loc1 et Puf6, à propos desquelles des résultats avaient déjà été rapportées (Lindstrom et al., 2003). Ainsi, les résultats des expériences de co-IP confirment que les répresseurs traductionnels Puf6 et Loc1 sont recrutés lors de l'élongation de la transcription et l'interaction de Puf6 avec Spt4-Spt5 nécessite la présence d'ARNm, tel que proposé précédemment avec She2 (Shen et al., 2010a).

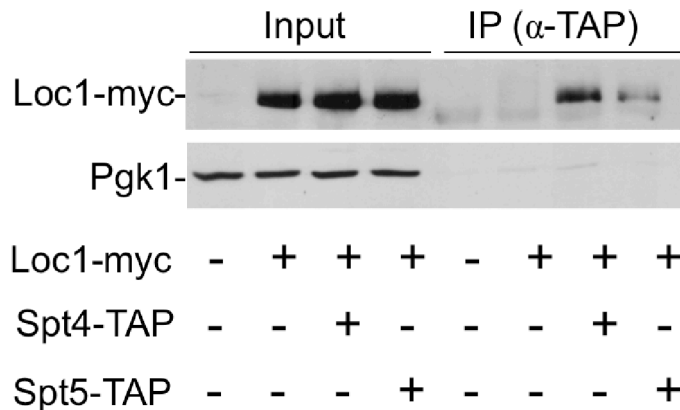


Figure 20. Interaction entre le dimère de régulation de la transcription Spt4/Spt5 et Loc1. Immunoprécipitation (IP) de Spt4-TAP et Spt5-TAP avec l'anticorps spécifique à l'épitope TAP (α -TAP). Une fraction de 3% à 5% des lysats cellulaires (INPUT) et une fraction de 30% à 45% de l'IP sont présentées. La détection par immunobuvardage (IB) de Loc1-myc avec l'anticorps spécifique à l'épitope myc (α -myc) et de la protéine constitutive Pgk1 (α -Pgk1) a été observée dans les souches BY4741 sauvages, *LOC1-MYC*, *LOC1-MYC SPT4-TAP* et *LOC1-MYC SPT5-TAP*.

Toutefois, l'établissement de ces interactions ne suggère pas nécessairement que Puf6 et Loc1 sont présents sur le gène *ASH1* directement. De plus, la collaboration entre les répresseurs traductionnels cytoplasmiques de l'ARNm *ASH1*, observé à partir des essais luciférase, pourrait aussi se traduire par une coordination lors de leur recrutement sur le gène *ASH1*. Il est attendu que Khd1 et Puf6 s'associent sur le gène *ASH1* au moment de la transcription de leurs sites de liaisons, correspondants à deux motifs distincts. Ainsi, la participation d'un tiers facteur nucléaire présent sur les deux sites de liaison, tel que Loc1, serait certainement favorable à la coordination des facteurs de la voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. D'ailleurs, Loc1 fait partie des facteurs en complexe avec Puf6 (Komili et al., 2007). Pour démontrer la présence et la coordination de répresseurs traductionnels de l'ARNm *ASH1* sur le gène *ASH1*, nous avons étudié la dépendance entre les facteurs Loc1 et Puf6 au moment de leur recrutement. Pour ce faire, mon collègue, Zhifa Shen, a reproduit les expériences d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP) à partir des souches *loc1 PUF6-TAP* et *Puf6 LOC1-TAP*, que j'ai construites dans cette optique.

3.2.2. Des expériences de ChIP démontrent un recrutement coordonné de Puf6 et de Loc1 directement sur la séquence *ASH1*

L'interaction, démontrée par Co-IP, des répresseurs traductionnels Puf6 et Loc1 avec le dimère de régulation de la transcription Spt4-Spt5 confirme que ces facteurs sont recrutés au complexe d'élongation, c'est-à-dire durant la transcription. Toutefois, les liaisons de Puf6 et de Loc1 sur l'ARNm *ASH1* pourraient être indépendantes l'une de l'autre, ainsi que du dimère Spt4-Spt5. Pour appuyer la présence des facteurs Puf6 et Loc1 directement sur la séquence *ASH1*, leur liaison a été confirmée à l'aide de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). De plus, des expériences de délétion à partir de la même technique ont permis de définir que le mécanisme de recrutement des répresseurs traductionnels Puf6 et Loc1 nécessite une coordination entre eux.

La technique de ChIP est une méthode qui permet d'observer le recrutement d'une protéine d'intérêt sur des séquences d'ADN/ARN connues (**Figure 21**). Tout d'abord, la protéine est réticulée sur la chromatine *in vivo*, avec l'ajout de formaldéhyde. Ensuite, la membrane des levures est brisée pour exposer tout le contenu intracellulaire. Les brins d'ADN/ARN sont scindés en morceaux de 0,2 à 1 kb de longueur, à l'aide d'un traitement aux ultrasons. Ainsi, les brins d'ADN/ARN sont suffisamment petits pour permettre la purification du complexe par immunoprécipitation de la protéine d'intérêt, selon les mêmes principes que ceux expliqués précédemment pour la technique de co-IP. Toutefois, les interactants détectés sont les séquences d'ADN/ARN du complexe purifié. Ainsi, pour libérer les protéines préalablement fixées sur l'ADN/ARN, les extraits conservés sont chauffés pour

éliminer les pontages générés par la formaldéhyde. Les séquences des brins d'ADN/ARN sont identifiées par amplification de séquence spécifique à l'aide de la technique de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR). La technique de qPCR permet d'observer l'amplification des fragments d'ADN recueillis en *continuum* ce qui suggère une quantification des amplicons observés plus précise, comparativement à la méthode de PCR standard.

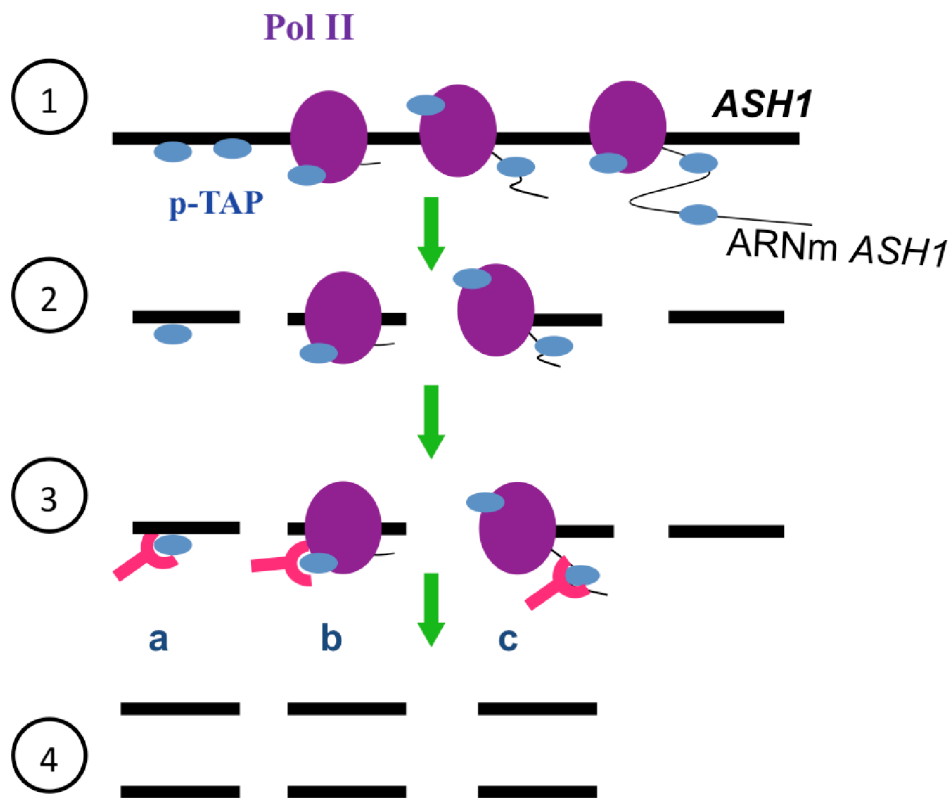


Figure 21. Description de la technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP). Les protéines sont fixées sur l'ARN / l'ADN in vivo à l'aide de formaldéhyde (1). Ensuite, les brins d'ARN et d'ADN sont clivés par sonication en petits fragments d'environ 0,2 à 1 kb (2). La protéine d'intérêt fusionnée à l'épitope TAP (p-TAP), dans le cas présent, est purifiée par IP avec un anticorps spécifique (3). Les séquences amplifiées peuvent correspondre à une liaison entre p-TAP et : la séquence d'ADN directement (a), la machinerie de transcription

reliée à la séquence **(b)** l'ARNm en élongation **(c)**. Les fragments ainsi immunoprécipités sont amplifiés et identifiés avec des amorces spécifiques par PCR en temps réel (qPCR) **(4)**.
Source : Modifié d'une correspondance personnelle de Zhifa Shen.

Le recrutement de Puf6-TAP et de Loc1-TAP sur la séquence *ASH1* de l'élément de localisation E3, correspondant à leur site de liaison sur l'ARNm, est investigué selon le protocole publié (Shen et al., 2010a) et appliqué par Zhifa Shen dans des souches sauvages et de délétion *loc1 PUF6-TAP* et *puf6 LOCI-TAP*, que j'ai généré pour ces essais **(Figure 22)**. Ainsi, l'ADN/ARN recueilli est amplifié par qPCR et les sites de liaisons sont identifiés avec des amorces correspondant à la séquence du promoteur *ASH1* (PRO) et à la séquence de l'élément de localisation E3 de l'ARNm *ASH1* **(Figure 22A)**.

Tel qu'attendu, les résultats démontrent, que Loc1-TAP est recrutée seulement sur la séquence E3, comparativement à la séquence PRO et au contrôle négatif de la séquence E3, représentatif de l'ADN/ARN extrait d'une IP effectuée avec les billes de Sépharose seulement (B-E3) **(Figure 22B)**. De plus, le recrutement de Loc1 sur la séquence E3 est similaire en absence de Puf6, tel qu'observé dans la souche *puf6 LOCI-TAP*. Ce résultat indique que la protéine Puf6 n'a pas d'influence sur le recrutement de la protéine Loc1-TAP sur la séquence de l'élément de localisation E3 du gène *ASH1*.

Toutefois, la protéine Loc1 est nécessaire au recrutement de Puf6 durant la transcription de la séquence E3. En effet, Puf6-TAP est aussi recrutée seulement sur la séquence E3 comparativement à la séquence PRO et B-E3. Mais en absence de *LOCI*, le recrutement de Puf6 diminue. Ainsi, le signal de détection de la séquence E3 est réduit dans la

souche *loc1 PUF6-TAP* comparativement à la souche *PUF6-TAP* (**Figure 22C**). Ces résultats suggèrent une coordination dans le recrutement des facteurs de répression traductionnel sur l'élément de localisation E3 de la séquence *ASH1*, où *Loc1* serait nécessaire au recrutement de *Puf6*.

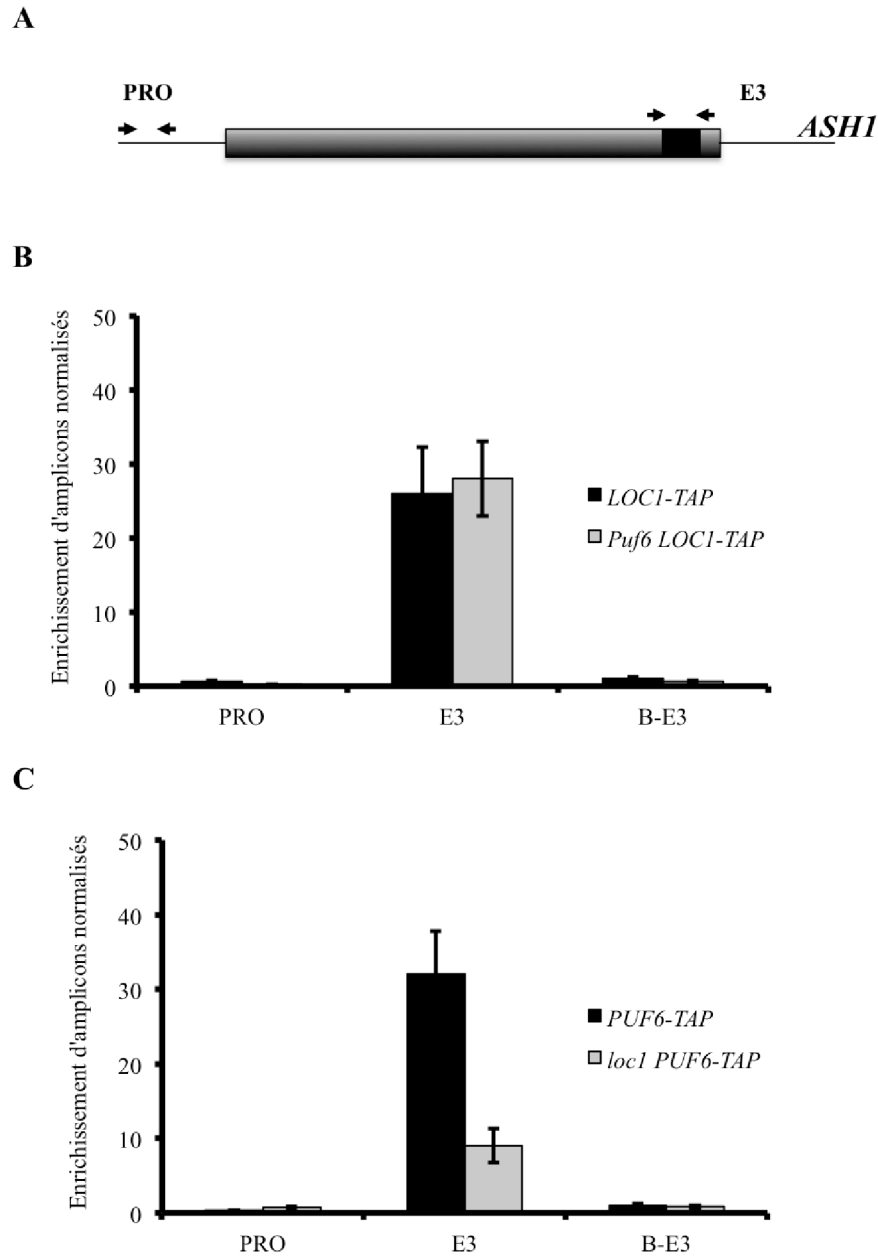


Figure 22. Recrutement coordonné des facteurs de traduction Loc1-TAP et Puf6-TAP sur le gène *ASH1*. (A) Schéma des séquences du promoteur (PRO) et de l'élément de localisation E3 (E3) amplifiées par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques auprès des extraits obtenus par ChIP. (B) Représentation graphique de l'amplification de séquences spécifiques contenues dans les extraits de ChIP suivant l'IP de Loc1-TAP dans les souches sauvages

(*LOC1-TAP*) et de délétion du facteur Puf6 (*Puf6 LOC1-TAP*). (C) Représentation graphique de l'amplification de séquences spécifiques contenues dans les extraits de CHIP suivant l'IP de Puf6-TAP dans les souches sauvages (*PUF6-TAP*) et de délétion du facteur Loc1 (*loc1 PUF6-TAP*). La normalisation de l'enrichissement des amplicons est obtenu selon la procédure décrite dans (Shen et al., 2010a). Les données normalisées ont été produitent par Zhifa Shen, à l'aide des souches *puf6 LOC1-TAP* et *loc1 PUF6-TAP* (Shen, 2010).

Discussion

La régulation de la traduction des ARNm localisés est nécessaire à l'expression spatio-temporelle des transcrits localisés et à leur fonction dans divers phénomènes cellulaires tels que la motilité, la plasticité synaptique, le développement et la division cellulaire asymétrique (DCA). En absence de répresseur traductionnel, les protéines synthétisées à partir des ARNm localisés ne sont plus exprimées localement et leur présence répandue dans la cellule entraîne une perturbation considérable des phénomènes dans lesquels elles sont impliquées. Pour mieux comprendre les mécanismes qui régulent la localisation par transport dirigé des ARNm, notre laboratoire utilise le modèle populaire de l'ARNm *ASH1* chez la levure *S. cerevisiae*.

La traduction de l'ARNm *ASH1* est régulée durant son transport dirigé par divers répresseurs traductionnels nécessaires à la concentration locale de la protéine Ash1 à l'extrémité du bourgeon durant la fin de l'anaphase, soit Khd1, Puf6 et Loc1. Ainsi, plusieurs facteurs sont requis pour réguler la traduction de l'ARNm *ASH1* et supporter la DCA chez la levure. Toutefois, aucune étude ne s'est intéressée à l'interrelation possible entre ces répresseurs et à la présence d'une ou de plusieurs voies de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Ce manque d'information nuit à la caractérisation des mécanismes moléculaires de régulation de la traduction observés chez la levure, qui sont souvent représentatifs du fonctionnement cellulaire d'autres espèces. Le but de la présente étude était de définir les relations fonctionnelles entre les facteurs de répression traductionnelle connus de l'ARNm *ASH1*.

Cette étude a mené à l'identification d'une collaboration entre les facteurs de régulation traductionnelle cytoplasmiques Khd1 et Puf6, ce qui a permis d'établir la présence

d'une seule voie connue de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. L'initiation de cette voie a été observée comme ayant lieu durant la synthèse de l'ARNm et montre aussi une coordination du recrutement cotranscriptionnel des répresseurs traductionnels Puf6 et Loc1. Il a été démontré précédemment que le recrutement de Loc1 et de Puf6 sur l'ARNm *ASH1* nécessite la présence de She2 dans le noyau (Shen et al., 2009). En plus, l'interaction entre la machinerie d'élongation de la transcription et Puf6, démontrée par Co-IP dans cette étude, nécessite la présence d'ARN. Ainsi, l'ensemble des résultats permet de proposer un modèle de coordination du recrutement des facteurs de régulation de la traduction sur l'ARNm *ASH1* durant sa synthèse. En effet, le recrutement aurait lieu selon un ordre établi, à partir du facteur de localisation She2, sur tous les éléments de localisation et ensuite, des protéines Loc1 et Puf6, respectivement, sur l'élément de localisation E3 (**Figure 23**). Depuis, notre laboratoire a développé un modèle général du recrutement de ces facteurs sur les ARNm localisés au bourgeon, décrit dans l'article « Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization » présenté en annexe 2 (Shahbadian et al., 2014).

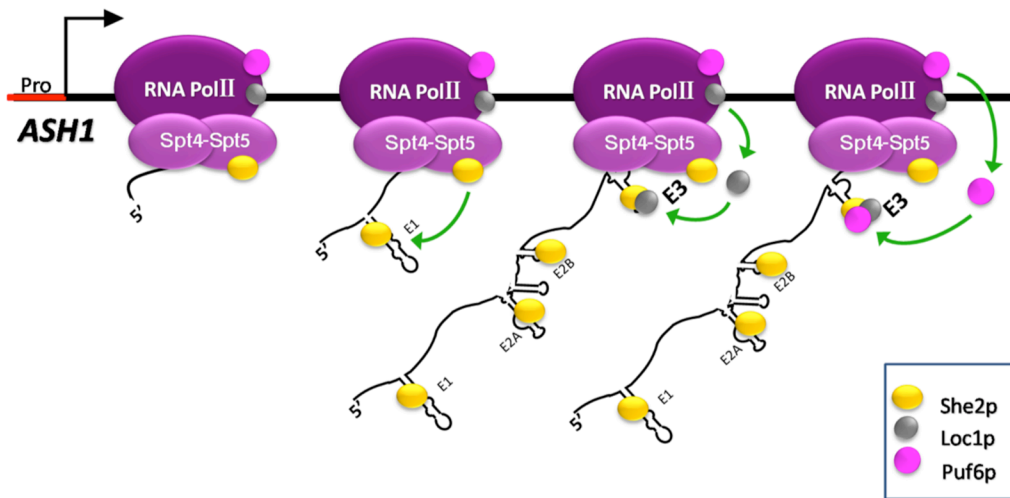


Figure 23. Modèle d'assemblage séquentiel des facteurs She2, Loc1 et Puf6 sur l'ARNm *ASH1* durant son élongation. Tout d'abord, les facteurs She2, Loc1 et Puf6 sont recrutés sur la machinerie de transcription en élongation par le dimère Spt4-Spt5. Par la suite, She2 lie les quatre éléments de localisation, soit les éléments E1, E2A, E2B et E3. Cette interaction est nécessaire au recrutement de Loc1 sur l'élément E3 spécifiquement et de Puf6 par la suite. Présenté par affiche, par moi-même, au séminaire « Translational Control » (Shen et al., 2010b).

4.1. Identification d'une voie commune de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

À ce jour, l'interprétation des données concernant les mécanismes moléculaires des répresseurs traductionnels cytoplasmiques de l'ARNm *ASH1* pouvait suggérer la présence d'une ou de deux voies de régulation de la traduction du transcrit *ASH1*. En effet, les facteurs

Khd1 et Puf6 sont impliqués dans des mécanismes moléculaires généraux similaires. Khd1 et Puf6 bloquent l'initiation de la traduction durant le transport et permettent celle-ci après avoir subi une phosphorylation. Néanmoins, Khd1 et Puf6 interagissent avec des facteurs cellulaires et des éléments de localisation différents sur l'ARNm *ASH1*. Khd1 s'associe à l'élément E1, cible eIF4G durant le transport et est phosphorylé par Yck1 (Paquin et al., 2007). Tandis que, Puf6 lie l'élément E3 ainsi que FUN12 durant la localisation de l'ARNm *ASH1* et permet la traduction après sa phosphorylation par CK2 (Deng et al., 2008). Puisque ces expériences fonctionnelles préalables avaient été effectuées à l'aide d'un seul élément de localisation respectif, la collaboration entre ces deux facteurs de répression traductionnelle n'avait pu être établie. En intégrant les deux éléments de localisation à des expériences de délétion, nous avons été en mesure d'observer l'effet concerté des phénotypes de régulation traductionnelle d'Ash1 à l'aide de la technique de gènes rapporteurs luciférases. En effet, l'absence des deux répresseurs cytoplasmiques Khd1 et Puf6 est nécessaire pour augmenter le niveau du rapporteur Ash1-luc dans les souches exprimant le transcrit *ASH1-LUC* possédant les éléments de localisation E1 et E3 (**Figure 15**). Toutefois, lorsqu'un seul répresseur cytoplasmique est absent (soit Khd1 ou Puf6), le niveau d'expression d'Ash1-luc est similaire à celui d'une souche sauvage. L'effet concerté ainsi démontré suggère une redondance entre les facteurs Khd1 et Puf6 pour réguler *ASH1*. Cette collaboration indique une redondance phénotypique et la participation de ces deux facteurs au niveau de l'initiation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

4.1.1 Puf6 stimule le rôle de répression traductionnel de Khd1

Néanmoins, le facteur Puf6 semble avoir une influence prédominante auprès de la voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*, comparativement au facteur Khd1. En effet, les résultats montrent qu'en présence de l'élément de localisation E1, l'activité luciférase est significativement plus élevée en absence des deux facteurs, contrairement aux essais effectués avec l'élément E3 seulement. Ainsi, Puf6 stimule le rôle de répression traductionnel de Khd1 et non l'inverse. Il est tentant de spéculer que l'implication de Puf6 dans la ribogénèse influence le résultat des essais luciférase (Lee et al., 2007). En effet, l'activité luciférase relative est établie sur la concentration totale de protéine. Ainsi, l'absence de Puf6 dans la cellule pourrait diminuer la concentration de plusieurs protéines dû à son effet sur la biogénèse des ribosomes, et ce de manière plus significative que Khd1. D'ailleurs, il est connu que les facteurs Khd1 et Puf6 agissent sur plusieurs autres ARNm et leur délétion provoque un niveau de protéines total différent. Pour éliminer ce biais, l'utilisation d'un deuxième plasmide permettant de normaliser le signal de la luciférase de la luciole, telle que la luciférase de la rénilla, serait nécessaire. Ainsi, le niveau d'activité de la luciférase de la luciole serait évalué plus directement et indépendamment du nombre de protéines total des lysats. Pour ce faire, l'élaboration d'un plan de clonage pour un plasmide ayant la séquence de la protéine luciférase de la rénilla sous le contrôle d'un promoteur fort, soit ADH, est présenté en annexe 3. Ce plan pourrait être utilisé pour la construction du plasmide comprenant la séquence de la luciférase de la rénilla et la transformation des souches contenant le plasmide de la luciférase de la luciole dans une expérience ultérieure.

4.1.2 Effet négligeable des phénotypes de régulation traductionnelle d'Ash1 à partir d'essais génétiques basée sur sa distribution asymétrique

Dans cette recherche, la technique de gènes rapporteurs luciférase a permis l'observation de la collaboration des facteurs Khd1 et Puf6 dans leur fonction de répression traductionnelle. Toutefois, il était d'abord attendu d'être en mesure d'évaluer l'effet des phénotypes de régulation traductionnelle d'Ash1 à partir d'essais génétiques basée sur sa distribution asymétrique. Néanmoins, aucune conclusion n'a pu être tirée des essais génétiques basés sur la distribution asymétrique d'Ash1, puisque la fonction connue des répresseurs traductionnels Khd1 et Puf6 n'a pu être observée avec cet essai. Au préalable, la fonction de Khd1 avait été documentée par le groupe de recherche d'Ira Herskowitz à l'aide de la même technique. Cependant, ces chercheurs avaient employé une souche *myo4-910*, qui possède une faible mutation du gène codant pour la protéine motrice Myo4 permettant d'exacerber le phénotype de la souche *khd1*, et ainsi de détecter la fonction de Khd1 (Irie et al., 2002). Dans la présente étude, la souche *she3-1440*, provenant de ce groupe de chercheurs et disponibles dans notre laboratoire, ont été utilisées. Des résultats similaires étaient attendus puisque les gènes *SHE1/MYO4* et *SHE3* font tous deux partie de la famille de gènes *SHE* et codent pour des protéines du complexe de transport du locosome (Jansen et al., 1996) (Bobola et al., 1996). De plus, les souches *she3-1440* et *myo4-910* présentent des phénotypes similaires lorsque la protéine Khd1 est surexprimée (Irie et al., 2002). Cependant, en absence des modulations de l'expression de Khd1, les souches *she3-1440* présentent un phénotype prononcé de délocalisation de la protéine Ash1 (**Figure 12**) comparativement aux souches *myo4-910* ayant un faible phénotype (Irie et al., 2002). Ainsi, les résultats de cette étude supportent un rôle plus important de She3 dans la localisation de l'ARNm *ASH1*,

comparativement à la protéine motrice Myo4. D'ailleurs, un groupe de recherche a récemment démontré que She3, en plus d'être une protéine d'échafaudage, est une protéine de liaison à l'ARNm qui favorise la force d'interaction entre l'ARNm *ASH1* et She2, un facteur essentiel à sa localisation (Müller et al., 2011). Ainsi, l'utilisation d'un souche *myo4-910* au lieu d'une souche *she3-1440* aurait peut-être permis l'observation de phénotypes plus prononcés sur la distribution de Ash1 avec des délétions de *KHD1* et *PUF6*. En effet, l'utilisation de souches *she3-1440* dans notre étude n'a pas permis l'accentuation des phénotypes de délétion de *KHD1* et *PUF6*, puisque le phénotype initial de celles-ci était plus exacerbé qu'attendu. Conséquemment, l'effet des délétions de gènes correspondant aux répresseurs traductionnels cytoplasmiques de l'ARNm *ASH1* paraissait négligeable.

Par ailleurs, les souches *puf6* présentaient un phénotype similaire à celui des souches *khd1*, et ce, malgré le rôle connu de Puf6 dans la délocalisation de l'ARNm *ASH1*. Toutefois, selon les résultats des essais génétiques basés sur la distribution asymétrique d'Ash1 de la présente étude, il serait probable que Puf6 n'ait pas d'influence sur la localisation de l'ARNm *ASH1*, mais seulement sur la localisation de la protéine Ash1, comme Khd1. En effet, à l'aide d'une technique de FISH plus sensible, notre laboratoire avait précédemment déterminé que Khd1 n'avait aucune influence sur la localisation de l'ARNm *ASH1*, ce qui avait paradoxalement permis sa découverte (Paquin et al., 2007). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer de nouveau le rôle de Puf6 sur la localisation de l'ARNm *ASH1* à l'aide de la même méthode de FISH.

4.1.3 Perspectives concernant la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* dans le cytoplasme

La présence d'un autre facteur, tel que Loc1, pourrait aussi influencer les résultats sur le niveau de la traduction de l'ARNm *ASH1*. En effet, la protéine Loc1 peut s'associer directement à l'élément E3 en absence de Puf6. Dans ces conditions, il est possible que l'influence véritable de Khd1 soit masquée par la présence de Loc1 sur l'élément E3, lorsque son élément cible E1 est absent. D'ailleurs, Loc1 semble aussi interagir avec l'élément E1 (Long et al., 2001). Toutefois, notre laboratoire a démontré tout récemment, avec des expériences de ChIP, que ce n'est pas le cas durant la synthèse de l'ARNm *ASH1* (Shahbadian et al., 2014). Néanmoins, les essais luciférase de cette étude démontrent que le niveau de traduction d'*ASH1*, contenant les éléments de localisation E1 et E3 (**Figure 15D**), dans les souches *khd1 puf6* est environ de moitié moindre, comparativement au niveau d'expression d'*ASH1* contenant l'élément de localisation E1 seulement (**Figure 15B**). Ce résultat supporte la présence d'un ou de plusieurs autres facteurs participant à la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* et nécessitant une interaction avec l'élément de localisation E3. Ainsi, il pourrait être intéressant de reproduire les expériences luciférase avec l'ajout de souches de délétion du gène *LOCI* pour déterminer l'influence du facteur de répression traductionnelle Loc1 sur la voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*. De la même manière, l'influence de nouveaux gènes pourrait être investiguée, par exemple *PRP5* et *YHR078W*, qui interagissent tous deux par essais complémentaire des protéines (PCA) simultanément avec Puf6 et Loc1 (Tarassov et al., 2008).

4.2. Initiation de la voie de régulation de la traduction commence par le recrutement coordonné des facteurs de répression traductionnelle sur l'ARNm *ASH1* durant sa synthèse

L'association de Puf6 et possiblement Loc1 avec Spt5 avait déjà été proposée par l'équipe de recherche du Dr. Hartzog (Lindstrom et al., 2003). Nous avons confirmé l'interaction des facteurs de régulation de la transcription Spt4-TAP et Spt5-TAP avec les répresseurs traductionnels Puf6-Myc et Loc1-Myc à l'aide de la méthode de Co-IP. Ainsi, nous avons montré que les facteurs Puf6 et Loc1 sont recrutés sur la machinerie de transcription lorsque le dimère Spt4-Spt5 est présent, c'est-à-dire durant la phase d'élongation des ARN. Néanmoins, l'interaction entre la grande sous-unité de l'ARN polymérase II, Rpb1, avec Puf6 et Loc1 n'a pu être établie, et ce malgré l'utilisation de différents marqueurs et anticorps pour détecter ces protéines. En effet, aucune interprétation des résultats n'a pu être tirée en l'absence de contrôle négatif représentatif des expériences. Les contrôles utilisés précédemment ont été reproduits, mais ne sont pas représentatifs des conditions expérimentales des essais CoIP de cette étude (**Figure 16**). Toutefois, les contrôles effectués ont démontré l'efficacité de l'anticorps 8WG16. Ainsi, l'utilisation d'un nouvel anticorps pour détecter la machinerie de transcription reconnaissant la sous-unité Rpb2, par exemple, aurait probablement entraîné les mêmes difficultés dans l'obtention d'un contrôle négatif.

Pour réduire le bruit de fond correspondant au signal présent dans les échantillons de contrôle négatif, la méthode TAP pour « tandem affinity purification » a été envisagée (Rigaut et al., 1999) (Puig et al., 2001). Cette méthode nécessite l'utilisation de l'étiquette TAP,

comme celle ajoutée aux protéines d'intérêts de cette étude. Toutefois, la purification du complexe protéique repose sur l'utilisation successive de deux colonnes d'affinité. Les IP de cette étude consistent en la première étape de cette méthode. En effet, l'étiquette TAP est composée d'un site de liaison à la calmoduline suivi d'un site de clivage du virus de la gravure du tabac (TEV) et de la protéine A, qui permet une IP avec l'anticorps IgG. Néanmoins, il est possible d'éluer le complexe avec la protéase TEV et d'effectuer une seconde purification avec une colonne d'affinité pour la calmoduline. Cependant, cette technique plus coûteuse aurait possiblement provoqué la perte complète du signal de détection, puisque selon nos résultats contrôles, le problème réside dans le choix de la souche d'origine.

Contrairement aux souches SC288 utilisées dans les essais, les souches W303 produisent un bruit de fond moins élevé lors des expériences de co-immunoprécipitation de Puf6 ou Rpb1. La similitude entre leurs génomes est de 85,4% (Ralser et al., 2012) et cette différence génomique pourrait expliquer les propriétés de reconnaissance de la protéine Rpb1 par son anticorps spécifique, 8WG16, dans les souches SC288 (**Figure 16-17**). En effet, les souches W303 et les souches d'origine SC288, telle que BY4741, présentent une distribution intragénique d'ARN polymérase II active différente (Rodríguez-Gil et al., 2010). De plus, le contrôle négatif présenté dans cette étude n'a jamais été rapporté dans la littérature, probablement parce qu'il est difficile à produire dans les souches SC288.

Par ailleurs, il aurait été fastidieux de transférer les mutants thermosensibles de Spt5 dans des souches W303 par sporulation des levures, dissection et recombinaison des tétrades. Ainsi, faute de temps, la recherche d'interaction avec un anticorps spécifique contre la machinerie de transcription a été abandonnée et l'interaction des facteurs Puf6 et Loc1 avec la

machinerie de transcription a été démontré par co-IP dans les souches BY4741 exprimant les facteurs Spt4 et Spt5 marqué avec l'épitope TAP. De plus, nos résultats montrent que l'interaction entre la Spt4/Spt5 et Puf6 s'effectue en présence d'ARN, puisque le signal disparaît à la suite d'un traitement avec les enzymes RNases. Ainsi, nous proposons que le répresseur traductionnel Puf6 est recruté directement sur l'ARNm durant sa synthèse. Pour confirmer cette hypothèse, il fallait d'abord déterminer l'emplacement de ce recrutement sur le génome et ensuite établir si la présence d'ARN influence cette liaison.

Pour connaître l'emplacement du recrutement des facteurs de régulation traductionnel sur le génome, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine a été utilisée. Grâce à cette méthode, nous avons établi que les facteurs Loc1 et Puf6 se lient spécifiquement sur le *locus* de l'élément de localisation E3 sur le gène *ASH1*. De plus, les résultats des expériences de délétion de cette recherche ont démontré que Loc1 s'associe d'abord sur l'élément E3, ce qui permet par la suite le recrutement de Puf6 (**Figure 22**). Toutefois, pour confirmer que ce recrutement a lieu directement sur l'ARNm *ASH1* de manière co-transcriptionnelle, les expériences de ChIP ont été reproduites dans notre laboratoire en ajoutant des traitements aux RNases (Shahbadian et al., 2014).

Jusqu'à tout récemment, aucune expérience de délétion de She2 n'avait été effectuée pour confirmer la nécessité de ce facteur dans le recrutement co-transcriptionnel de Loc1 et Puf6. À l'aide des techniques de Co-IP et de ChIP, notre laboratoire a démontré que She2 est essentiel au recrutement cotranscriptionnel de Loc1 et Puf6 sur plusieurs ARNm, dont *ASH1* (Shahbadian et al., 2014). De plus, des expériences de GST-pull down ont permis d'identifier un complexe entre Loc1 et Puf6 *in vitro*, indépendant de la présence de She2 ou de la liaison

de Puf6 sur l'ARN (Shahbadian et al., 2014). Ainsi, Loc1 semble servir de pont entre She2 et Puf6, qui sont tous deux associés à l'ARNm *ASH1*. En effet, il a été démontré que Loc1 interagit aussi directement avec She2, *in vitro* et *in vivo* (Niedner et al., 2013). Néanmoins, il serait pertinent de déterminer si la liaison de Puf6 avec le dimère Spt4/5 est dépendante du recrutement de Loc1 sur l'ARN. Pour ce faire, des expériences de Co-IP de Loc1-myc et de Puf6-myc avec les facteurs de régulation Spt4-TAP et Spt5-TAP devraient être effectuées de nouveau dans des souches de délétion *PUF6* et *LOC1*, respectivement. Ces résultats permettraient de confirmer que Loc1 n'a pas d'autre fonction durant le recrutement de Puf6 que celle de protéine d'échafaudage. De plus, les domaines de liaison entre les protéines She2 et Loc1 ainsi que ceux entre Puf6 et Loc1 restent à être identifiés.

4.2.1 Perspectives concernant le recrutement des facteurs de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* dans le noyau

Dans notre étude, nous avons démontré à l'aide de l'essai luciférase que Khd1 agit de manière redondante avec Puf6 pour réguler la traduction de l'ARNm *ASH1*. Ainsi, pour déterminer l'influence du recrutement de Khd1 dans cette régulation, il serait intéressant d'utiliser la même méthode que celle ayant permis de mettre en évidence l'implication de Spt4/Spt5, She2 et Loc1 dans le recrutement co-transcriptionnel de Puf6. D'ailleurs, il semblait de prime abord possible que Loc1 soit impliqué dans le recrutement de Khd1, puisque les expériences de triple hybride précédentes suggéraient que Loc1 puisse se lier à l'élément de localisation E1 de l'ARNm *ASH1*, qui est le site de liaison de Khd1 (Long et al., 2001). Toutefois, les résultats récents de notre laboratoire obtenus à l'aide de la technique de ChIP démontrent que le facteur Loc1 ne se lie pas à l'élément E1 durant la transcription de

l'ARNm *ASH1* (Shahbadian et al., 2014). Ces nouvelles données suggèrent que Loc1 ne serait pas impliqué dans le recrutement cotranscriptionnel de Khd1. Néanmoins, l'identification d'un facteur commun favorisant le recrutement des répresseurs traductionnels cytoplasmiques Khd1 et Puf6 permettrait de démontrer la présence d'un mécanisme de coordination de tous les facteurs impliqués dans la voie de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Pour établir l'importance du recrutement co-transcriptionnel dans l'exercice des fonctions des répresseurs traductionnels cytoplasmiques, l'évaluation du niveau de protéine Ash1 traduit pourrait être effectuée dans des expériences de mutation des NLS de Puf6 et Khd1 à l'aide de diverses techniques : essai luciférase, immunobuvardage, microscopie par fluorescence et gradients de sucrose, permettant d'établir précisément l'efficacité de la traduction. Ainsi, avec l'ajout d'expérience de délétion, il serait possible d'établir les relations de coordination entre le recrutement co-transcriptionnel de tous les répresseurs traductionnels connus de l'ARNm *ASH1*, soient Khd1, Puf6 et Loc1.

Toutes ces nouvelles données permettraient d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de la voie de régulation de l'ARNm *ASH1* et d'établir un modèle de coordination du recrutement des facteurs nécessaire à la localisation de la protéine Ash1. De plus, ce modèle serait vraisemblablement applicable à d'autres ARNm localisés chez la levure. Bien que Puf6 avait été prédit d'être associé à 13 des 24 transcrits liés par She2 (Gu et al., 2004) (Shepard et al., 2003), notre laboratoire a démontré par la technique de ChIP-chip que plus de 43 gènes sont occupés par Puf6, dont 5 sont des cibles connues de She2 (Shahbadian et al., 2014). Néanmoins, il serait intéressant d'utiliser la méthode ChIP-chip pour identifier les *loci* occupés par Loc1 et Khd1, et comparer leurs occupations avec celles de Puf6 afin d'établir

leurs implications communes sur les différents ARNm de la levure.

Conclusion

Le recrutement co-transcriptionnel des facteurs impliqués dans la localisation d'ARNm semble permettre un couplage rapide du transport et de la régulation de l'ARNm. Effectivement, une telle organisation permet d'assurer une réponse rapide et spécifique aux différents stimuli à partir du moment où l'ARNm est transcrit. Ainsi, la régulation de la localisation des ARNm ne se produit pas uniquement suite à son export nucléaire dans le cytoplasme. La découverte d'un mécanisme de recrutement co-transcriptionnel mis en évidence dans ce mémoire avec l'ARNm *ASH1*, montre l'importance que les facteurs de régulation traductionnelle des ARNm localisés lient leurs ARNm cibles avant leur export du noyau vers le cytoplasme, évitant ainsi une traduction précoce de ces transcrits. Il est essentiel que l'initiation de la traduction des ARNm localisés ait lieu à un moment établi, pour l'accomplissement de leurs fonctions dans les différents phénomènes cellulaires. Pour ce faire, la régulation traductionnelle semble s'effectuer en collaboration avec différents facteurs cellulaires ce qui permet une redondance fonctionnelle de la répression traductionnelle des ARNm localisés. Ce mécanisme permet une synchronisation du moment d'initiation de la traduction et favorise la coordination entre les facteurs impliqués dans la localisation d'ARN.

Bibliographie

Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., & Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* **123**, 431–441.

Algire, M.A., & Lorsch, J.R. (2006). Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 480–486.

Aronov, S., Gelin-Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E., & Gerst, J.E. (2007). mRNAs Encoding Polarity and Exocytosis Factors Are Cotransported with the Cortical Endoplasmic Reticulum to the Incipient Bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3441–3455.

Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., & Lipshitz, H.D. (1998). RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335–394.

Bergsten, S.E., Huang, T., Chatterjee, S., & Gavis, E.R. (2001). Recognition and long-range interactions of a minimal nanos RNA localization signal element. *Development* **128**, 427–435.

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., & Long, R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**, 437–445.

Besse, F., & Ephrussi, A. (2008). Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 971–980.

Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**, 835–851.

Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., & Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* **84**, 699–709.

Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., & Jansen, R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J.* **19**, 5514–5524.

Botstein, D., & Fink, G.R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* **240**, 1439–1443.

Botstein, D., & Fink, G.R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704.

Breeden, L., & Nasmyth, K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators. *Cell* **48**, 389–397.

- Bullock, S.L. (2011). Messengers, motors and mysteries: sorting of eukaryotic mRNAs by cytoskeletal transport. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1161–1165.
- Bullock, S.L., Ringel, I., Ish-Horowicz, D., & Lukavsky, P.J. (2010). A'-form RNA helices are required for cytoplasmic mRNA transport in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 703–709.
- Chandarlapaty, S., & Errede, B. (1998). Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2884–2891.
- Chang, P., Torres, J., Lewis, R.A., Mowry, K.L., Houliston, E., & King, M.L. (2004). Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4669–4681.
- Chao, J.A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S.C., & Singer, R.H. (2010). ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.* **24**, 148–158.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H., & Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr. Biol.* **9**, 333–336.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Hüttelmaier, S., Donato, D., & Singer, R.H. (2002). Asymmetric sorting of ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol. Cell* **10**, 1319–1330.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., & Hunt, D.F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2193–2198.
- Choder, M. (2004). Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 674–681.
- Christie, K.R., Awrey, D.E., Edwards, A.M., & Kane, C.M. (1994). Purified yeast RNA polymerase II reads through intrinsic blocks to elongation in response to the yeast TFIIS analogue, P37. *J. Biol. Chem.* **269**, 936–943.
- Chung, S., & Takizawa, P.A. (2010). Multiple Myo4 motors enhance ASH1 mRNA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* **189**, 755–767.
- Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S., & Krogan, N.J. (2007). Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 439–450.
- Cosma, M.P., Tanaka, T., & Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**, 299–311.

- Cosma, M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep.* **5**, 953–957.
- Czaplinski, K., & Singer, R.H. (2006). Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 687–693.
- Dahm, R., & Kiebler, M. (2005). Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature* **438**, 432–435.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., & Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 614–620.
- Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., & Asturias, F.A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol. Cell* **10**, 409–415.
- Deng, Y., Singer, R.H., & Gu, W. (2008). Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev.* **22**, 1037–1050.
- Denisenko, O., & Bomsztyk, K. (2002). Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 286–297.
- Di Talia, S., Wang, H., Skotheim, J.M., Rosebrock, A.P., Futcher, B., & Cross, F.R. (2009). Daughter-specific transcription factors regulate cell size control in budding yeast. *PLoS Biol.* **7**, e1000221.
- Di Talia, S., Skotheim, J.M., Bean, J.M., Siggia, E.D., & Cross, F.R. (2007). The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* **448**, 947–951.
- Ding, D., Parkhurst, S.M., Halsell, S.R., & Lipshitz, H.D. (1993). Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3773–3781.
- Dorfman, B.Z. (1969). The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* **61**, 377–389.
- Du, T.G., Jellbauer, S., Muller, M., Schmid, M., Niessing, D., & Jansen, R.P. (2008). Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO Rep.* **9**, 781–787.
- Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* **12**, 263–270.
- Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A., & Kornberg, R.D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* **266**, 71–75.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C., & St Johnston, D. (1994). Stauf protein

associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221–1232.

Forget, A., & Chartrand, P. (2011). Cotranscriptional assembly of mRNP complexes that determine the cytoplasmic fate of mRNA. *Transcription* **2**, 86–90.

Forrest, K.M., & Gavis, E.R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **13**, 1159–1168.

Fundakowski, J., Hermesh, O., & Jansen, R.-P. (2012). Localization of a subset of yeast mRNAs depends on inheritance of endoplasmic reticulum. *Traffic* **13**, 1642–1652.

Gagnon, J.A., & Mowry, K.L. (2011). Molecular motors: directing traffic during RNA localization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 229–239.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., & Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077–1090.

Gingras, A.C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546–563–7.

Gonsalvez, G.B., Lehmann, K.A., Ho, D.K., Stanitsa, E.S., Williamson, J.R., & Long, R.M. (2003). RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the ASH1 mRNA ribonucleoprotein complex. *Rna* **9**, 1383–1399.

Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., & Ahsen, von, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr. Biol.* **9**, 337–340.

Goode, B.L., & Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 593–627.

Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., & Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* **18**, 1452–1465.

Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., & Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519–2524.

Haber, J.E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 561–599.

- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., & Woolford, J.L.J. (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol. Cell* **8**, 505–515.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., & Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **12**, 357–369.
- Hasegawa, Y., Irie, K., & Gerber, A.P. (2008). Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *Rna* **14**, 2333–2347.
- Heym, R.G., & Niessing, D. (2011). Principles of mRNA transport in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1843–1853.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D., & Brown, P.O. (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.* **6**, e255.
- Holt, C.E., & Bullock, S.L. (2009). Subcellular mRNA Localization in Animal Cells and Why It Matters. *Science* **326**, 1212–1216.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., & Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512–515.
- Inaba, M., & Yamashita, Y.M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* **11**, 461–469.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., & Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *Embo J.* **21**, 1158–1167.
- Izban, M.G., & Luse, D.S. (1992). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J. Biol. Chem.* **267**, 13647–13655.
- Jambhekar, A., & Derisi, J.L. (2007). Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *Rna* **13**, 625–642.
- Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., & Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**, 687–697.
- Jansen, R.-P. (2001). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 247–256.
- Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and

characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513–525.

Kertesz, M., Wan, Y., Mazor, E., Rinn, J.L., Nutter, R.C., Chang, H.Y., & Segal, E. (2010). Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast. *Nature* **467**, 103–107.

Klann, E., & Dever, T.E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 931–942.

Kloc, M., Zearfoss, N.R., & Etkin, L.D. (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* **108**, 533–544.

Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., & Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Supp. Cell* **131**, 557–571.

Krebs, H.A. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem.* **8**, 1–34.

Kron, S.J., & Gow, N.A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 845–855.

Kron, S.J., Styles, C.A., & Fink, G.R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **5**, 1003–1022.

Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., & Jansen, R.P. (2002). Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J. Cell Biol.* **159**, 971–982.

Kumano, G. (2012). Polarizing animal cells via mRNA localization in oogenesis and early development. *Dev. Growth Differ.* **54**, 1–18.

Lee, I., Li, Z., & Marcotte, E.M. (2007). An improved, bias-reduced probabilistic functional gene network of baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **2**, e988.

Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., & Krause, H.M. (2007). Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* **131**, 174–187.

Li, Z., Lee, I., Moradi, E., Hung, N.J., Johnson, A.W., & Marcotte, E.M. (2009). Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biol.* **7**, e1000213.

Lindgren, C.C. (1945). An analysis of the mechanism of budding in yeasts and some observations on the structure of the yeast cell. *Mycologia* **37**, 767–780.

Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, K.C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Yates, J.R.3., & Hartzog, G.A. (2003). Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins.

Mol. Cell. Biol. **23**, 1368–1378.

Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., & Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J.* **19**, 6592–6601.

Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H., & Chartrand, P. (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J. Cell Biol.* **153**, 307–318.

Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., & Jansen, R.P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383–387.

Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961.

Lord, M., Sladewski, T.E., & Pollard, T.D. (2008). Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8014–8019.

Lotan, R., Goler-Baron, V., Duek, L., Haimovich, G., & CHODER, M. (2007). The Rpb7p subunit of yeast RNA polymerase II plays roles in the two major cytoplasmic mRNA decay mechanisms. *The Journal of Cell Biology* **178**, 1133–1143.

Marchand, V., Gaspar, I., & Ephrussi, A. (2012). An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 202–210.

Martin, K.C., & Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719–730.

Maxon, M.E., & Herskowitz, I. (2001). Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 1495–1500.

Medioni, C., Mowry, K., & Besse, F. (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development* **139**, 3263–3276.

Muller, M., Heuck, A., & Niessing, D. (2006). Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 171–180.

Muller, M., Richter, K., Heuck, A., Kremmer, E., Buchner, J., Jansen, R.P., & Niessing, D. (2009). Formation of She2p tetramers is required for mRNA binding, mRNP assembly, and localization. *Rna* **15**, 2002–2012.

Müller, M., Heym, R.G., Mayer, A., Kramer, K., Schmid, M., Cramer, P., Urlaub, H., Jansen, R.-P., & Niessing, D. (2011). A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS Biol.* **9**, e1000611.

Nasmyth, K. (1993). Regulating the HO endonuclease in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 286–294.

Niedner, A., Müller, M., Moorthy, B.T., Jansen, R.-P., & Niessing, D. (2013). Role of Loc1p in assembly and reorganization of nuclear ASH1 messenger ribonucleoprotein particles in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.1315289111.

Niessing, D., Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R.H., & Burley, S.K. (2004). She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell* **119**, 491–502.

Oeffinger, M., Wei, K.E., Rogers, R., DeGrasse, J.A., Chait, B.T., Aitchison, J.D., & Rout, M.P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Meth* **4**, 951–956.

Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., & Chartrand, P. (2005). Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4752–4766.

Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., & Hentze, M.W. (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4535–4543.

Pan, X., & Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8364–8372.

Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., & Chartrand, P. (2007). Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol. Cell* **26**, 795–809.

Paquin, N. (2008). Études des modifications post-traductionnelles de Khd1p et de leur rôle dans la régulation de la traduction de l'ARNm ASH1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Université de Montréal.

Paquin, N., & Chartrand, P. (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in Cell Biology* **18**, 105–111.

Parker, R. (2010). The life of eukaryotic mRNA. (U.Colorado Boulder).

Patel, V.L., Mitra, S., Harris, R., Buxbaum, A.R., Lionnet, T., Brenowitz, M., Girvin, M., Levy, M., Almo, S.C., Singer, R.H., & Chao, J.A. (2012). Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes Dev.* **26**, 43–53.

Pruyne, D., Gao, L., Bi, E., & Bretscher, A. (2004a). Stable and dynamic axes of polarity use

distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4971–4989.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., & Bretscher, A. (2004b). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 559–591.

Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**, 679–684.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., & Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218–229.

Quenault, T., Lithgow, T., & Traven, A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol.* **21**, 104–112.

Ralser, M., Kuhl, H., Ralser, M., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M., & Timmermann, B. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol* **2**, 120093.

Reese, J.C. (2013). The control of elongation by the yeast Ccr4-not complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 127–133.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030–1032.

Roberts, R.L., & Fink, G.R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development* **8**, 2974–2985.

Rodríguez-Gil, A., García-Martínez, J., Pelechano, V., Muñoz-Centeno, M. de L.C., Geli, V., Pérez-Ortín, J.E., & Chávez, S. (2010). The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Res* **38**, 4651–4664.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 327–335.

Roman, H. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr).

Rongo, C., Gavis, E.R., & Lehmann, R. (1995). Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* **121**, 2737–2746.

Rose, M.D., Winston, F.M., & Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).

Rosenheck, S., & CHODER, M. (1998). Rpb4, a subunit of RNA polymerase II, enables the enzyme to transcribe at temperature extremes in vitro. *J. Bacteriol.* **180**, 6187–6192.

Rouskin, S., Zubradt, M., Washietl, S., Kellis, M., & Weissman, J.S. (2014). Genome-wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures in vivo. *Nature* **505**, 701–705.

Schiestl, R.H., & Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* **16**, 339–346.

Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.-G., & Jansen, R.-P. (2006). Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Curr. Biol.* **16**, 1538–1543.

Selitre, M., Duek, L., Lotan, R., & CHODER, M. (2006). Nucleocytoplasmic Shuttling of the Rpb4p and Rpb7p Subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase II by Two Pathways. *Eukaryotic Cell* **5**, 2092–2103.

Semotok, J.L., Cooperstock, R.L., Pinder, B.D., Vari, H.K., Lipshitz, H.D., & Smibert, C.A. (2005). Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* **15**, 284–294.

SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., & Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8496–8501.

Serano, J., & Rubin, G.M. (2003). The *Drosophila* synaptotagmin-like protein bitesize is required for growth and has mRNA localization sequences within its open reading frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13368–13373.

Shahbadian, K., Jeronimo, C., Forget, A., Robert, F., & Chartrand, P. (2014). Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization. *Nucleic Acids Res.*

Shen, Z., St-Denis, A., & Chartrand, P. (2010a). Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev.* **24**, 1914–1926.

Shen, Z. (2010). A mechanism for co-transcriptional recruitment of mRNA

localization factor on nascent mRNAs in budding yeast. Université de Montréal.

Shen, Z., Forget, A., St-Denis, A., & Vergnaud, T. (2010b). Co-transcriptional recruitment of translational repressors Loc1p and Puf6p on nascent *ASH1* mRNA

. *Translational Control*.

Shen, Z., Paquin, N., Forget, A., & Chartrand, P. (2009). Nuclear shuttling of She2p couples

- ASH1 mRNA localization to its translational repression by recruiting Loc1p and Puf6p. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2265–2275.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., & Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11429–11434.
- Shi, H., & Blobel, G. (2010). UNC-45/CRO1/She4p (UCS) protein forms elongated dimer and joins two myosin heads near their actin binding region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 21382–21387.
- Sil, A., & Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**, 711–722.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., & Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* **21**, 1193–1198.
- St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**, 161–170.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 363–375.
- Strathern, J., Hicks, J., & Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis. *J. Mol. Biol.* **147**, 357–372.
- Sundell, C.L., & Singer, R.H. (1991). Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* **253**, 1275–1277.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., & Vale, R.D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* **290**, 341–344.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., & Vale, R.D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**, 90–93.
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Molina, M.M.S., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., & Michnick, S.W. (2008). An in Vivo Map of the Yeast Protein Interactome. *Science* **320**, 1465–1470.
- Thio, G.L., Ray, R.P., Barcelo, G., & Schüpbach, T. (2000). Localization of gurken RNA in Drosophila oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev. Biol.* **221**, 435–446.
- Toi, H., Fujimura-Kamada, K., Irie, K., Takai, Y., Todo, S., & Tanaka, K. (2003). She4p/Dim1p interacts with the motor domain of unconventional myosins in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2237–2249.

- Urbinati, C.R., Gonsalvez, G.B., Aris, J.P., & Long, R.M. (2006). Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Mol. Genet. Genomics* **276**, 369–377.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., Buratowski, S., & Handa, H. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* **12**, 343–356.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D., & Hall, T.M. (2002). Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* **110**, 501–512.
- Wells, D.R., Tanguay, R.L., Le, H., & Gallie, D.R. (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes & Development* **12**, 3236–3251.
- Wesche, S., Arnold, M., & Jansen, R.-P. (2003). The UCS domain protein She4p binds to myosin motor domains and is essential for class I and class V myosin function. *Curr. Biol.* **13**, 715–724.
- Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J., & Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* **18**, 150–157.
- Winston, F., Chaleff, D.T., Valent, B., & Fink, G.R. (1984). Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **107**, 179–197.
- Wolf, J.J., Dowell, R.D., Mahony, S., Rabani, M., Gifford, D.K., & Fink, G.R. (2010a). Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics* **185**, 513–522.
- Wolf, S., Rataj, F., Zierau, O., Ostermann, K., Diel, P., Parr, M.K., Vollmer, G., & Rodel, G. (2010b). A novel combined approach to detect androgenic activities with yeast based assays in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol Lett* **199**, 410–415.
- Wooddell, C.I., & Burgess, R.R. (2000). Topology of yeast RNA polymerase II subunits in transcription elongation complexes studied by photoaffinity cross-linking. *Biochemistry* **39**, 13405–13421.
- Woychik, N.A., & Young, R.A. (1989). RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2854–2859.
- Woychik, N.A., & Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**, 453–463.
- Xing, L., & Bassell, G.J. (2013). mRNA localization: an orchestration of assembly, traffic and synthesis. *Traffic* **14**, 2–14.

Zamore, P.D., Williamson, J.R., & Lehmann, R. (1997). The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *Rna* **3**, 1421–1433.

Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J., & Wickens, M.P. (1997). A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* **390**, 477–484.

Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dichtenberg, J.B., Singer, R.H., & Bassell, G.J. (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**, 261–275.

Annexes

**Annexe 1 : Article publié dans le journal *Transcription* (2011),
2(2), p.86–90.**

Cotranscriptional assembly of mRNP complexes that determine the cytoplasmic fate of mRNA

Amélie Forget and Pascal Chartrand*

Département de Biochimie, Université de Montréal
Montréal, Qc H3C 3J7 Canada

*Corresponding author

Unlike prokaryotes, in which transcription and translation are coupled, eukaryotes physically separate transcription in the nucleus from mRNA translation and degradation in the cytoplasm. However, recent evidence has revealed that the full picture is more complex, and that the nuclear transcription machinery plays specific roles in regulating the cytoplasmic fate of mRNA.

The crosstalk between transcription, translation and degradation of mRNA can be deduced intuitively for prokaryotes, since transcription and translation occur in the same time and space. Eukaryotes, on the other hand, segregate their chromosomes from the rest of the cell and the barrier of the nuclear membrane divides transcription from protein expression. It is now well established that transcription and nuclear mRNA processing are coupled, as mRNA maturation (capping, splicing and polyadenylation) and mRNA export are initiated on nascent transcripts¹. While a process like spliceosome assembly can be initiated during transcription, evidence suggest that some genes are spliced cotranscriptionally, while for others splicing occurs post-transcriptionally^{2, 3}. Moreover, these events depend on interactions between the transcription machinery and RNA processing factors, in which the transcription elongation complex acts as a platform to recruit these factors⁴. It is known that several RNA-binding proteins which specify the cytoplasmic fate of transcripts (i.e translational control, mRNA decay or mRNA localization) shuttle between the cytoplasm and the nucleus, and their presence in the nucleus is essential for their function⁵. For instance, the exon-junction complex (EJC), which is deposited on mRNA after splicing, follows transcripts to the cytoplasm where it enhances mRNA translation, targets transcripts to nonsense-mediated decay (NMD) and participates in mRNA localization⁶. However, it is still unclear to what extent these factors are recruited during the transcription of their target mRNA, and how this occurs. Here, we review current evidence showing how the RNA polymerase II transcription machinery directly affects mRNA translation, localization or degradation in the cytoplasm by promoting the cotranscriptional recruitment of RNA-binding proteins involved in these processes. This evidence comes mostly from the budding yeast, in which these pathways have

been well studied. However, since several of the factors involved are highly conserved throughout evolution, these mechanisms are likely relevant to higher eukaryotes as well.

Rpb4/7 couples transcription and cytoplasmic mRNA degradation

The RNA polymerase II is constituted of 12 subunits in eukaryotes, including 10 core subunits, which encompass the catalytic site, and the Rbp4-Rbp7 subcomplex (Rpb4/7), which forms a stalk-like protrusion on the RNA polymerase II core, in close proximity to the RNA exit channel⁷. Rpb7 is known to bind the nascent RNA, although with little specificity⁷. In yeast, deletion of *RPB7* is lethal, while Rpb4 is essential for viability only at high temperature⁸. Unlike the RNA polymerase II core subunits, Rpb4 and Rbp7 are essential only for transcription initiation *in vitro*, and are dispensable for transcription elongation⁹. Genome wide chromatin immunoprecipitation in yeast revealed that Rpb4/7 occupancy is identical to Rpb3, suggesting that this heterodimer is associated with RNA polymerase II throughout the transcription cycle¹⁰. Like most small subunits of RNA polymerase II in yeasts (*S. cerevisiae* and *S. pombe*), Rpb4 is in excess compared to the large subunits Rpb1, Rpb2 and Rpb3^{11, 12}. Moreover, Rpb4 and Rpb7 (and Rpb3 in humans cells¹³) are the only subunits that actively shuttle between the nucleus and the cytoplasm¹⁴, suggesting other roles for Rpb4/7 beside transcription.

Indeed, Rpb4/7 has been found to affect the cytoplasmic degradation of mRNA in yeast. In the cytoplasm, Rpb4 enhances the degradation of specific transcripts, called Protein Biosynthetic Factors mRNA (PBF mRNA) as they encode for ribosomal proteins or translational factors¹⁵. The turnover of PBF mRNA is extremely sensitive to environmental stimuli, and Rpb4 regulates their deadenylation and degradation rate in different conditions.

Rpb4 interacts physically and genetically with components of the major 5' to 3' mRNA degradation pathway in yeast, like Pat1 and Lsm2, and accumulates in cytoplasmic bodies called P bodies, which are sites of mRNA storage and degradation¹⁶. A role for Rpb7 in cytoplasmic mRNA decay has also been demonstrated¹⁷. The generation of thermosensitive mutants of Rpb7 in yeast revealed that some mutants displayed a defect in mRNA decay, and not in transcription, at the non-permissive temperature. These Rpb7 mutants compromised the degradation of both PBF and non-PBF transcripts, suggesting a more general role for Rpb7 in mRNA decay, compared to Rpb4. Unlike Rpb4, Rpb7 acts via both 5' to 3' and 3' to 5' mRNA degradation pathways, as it interacts physically and genetically with both pathways. While these results suggested a function for both Rpb4 and Rpb7 in cytoplasmic mRNA decay, it was still unclear if this function depends on the association of Rpb4/7 with the core subunits of RNA polymerase II.

Evidence emerged on the implication of the transcription machinery in Rpb4/7-dependent cytoplasmic mRNA decay¹⁸. Specific thermosensitive mutants of RNA polymerase II (Rpb6^{Q100R} and Rpb1^{C67S, C70S}), which disrupt interactions with the Rpb4/7 heterodimer, display defect in mRNA degradation similar to those observed previously for Rpb4 and Rpb7 mutants. This phenotype is specific for these *rpb6* and *rpb1* alleles, since other alleles of *RPB1* do not display a defective mRNA decay. Overexpression of Rpb4/7 partially rescues the defect in mRNA decay observed in the Rpb6^{Q100R} mutant, suggesting that the interaction between Rpb4/7 and RNA polymerase II is important for the role of Rpb4/7 in cytoplasmic mRNA degradation. These results strongly suggest that the cotranscriptional recruitment of Rpb4/7 by RNA polymerase II is necessary for its role in cytoplasmic mRNA decay, arguing against the possibility that the Rpb4/7 heterodimer can be recruited to mRNA independently

of the RNA polymerase. While the role of Rpb4/7 in mRNA decay has been observed mostly with transcripts that are part of the PBF family, little is known about its role in the general degradation of mRNA. It would be interesting to investigate if this mechanism applies to all mRNA.

Mechanistic Coupling between Transcription and Translation

Beside its role in cytoplasmic mRNA decay, a recent publication revealed another function for the Rpb4/7 complex in promoting efficient translation initiation¹⁹. Indeed, yeast Rpb4/7 was found to physically interact with Nip1 and Hcr1, two components of the translation initiation factor 3 (eIF3), which serves as a platform for the recruitment of the small ribosomal subunit during translation initiation²⁰. Deletion of *RPB4* and a conditional mutant allele of *RPB7* (*rpb7-26*) show reduced formation of polysomes and hypersensitivity to translation inhibitors. Importantly, the *rpb7-26* allele does not display any major defects in transcription or mRNA decay, suggesting that the effects observed on translation are not indirect. The role of Rpb4/7 in translation initiation was particularly evaluated during the stimulation of translation following exit from glucose starvation. During glucose starvation, mRNA is excluded from polysomes and stored in P bodies. When glucose is added back to yeast culture, the mRNA move from P bodies to the polysomes and resume translation²¹. This process was significantly reduced in the *rpb7-26* mutant and *RPB4* deletion strains, demonstrating an implication of Rpb4/7 in translation initiation.

An important point in this study was that the role of Rpb4/7 in translation initiation depends on its interaction with the core RNA polymerase II. Indeed, mutants defective in interaction of RNA pol II with Rpb4/7 (Rpb6^{Q100R} and Rpb1^{C67S, C70S}) also exhibit abnormal

pattern of translation. Furthermore, nuclear import of Rpb4 is essential to this new function, since a NLS-mutated Rpb4 displayed abnormal polysome profile. From these results, a model can be proposed in which RNA polymerase II regulates translation initiation by stimulating the binding of Rpb4/7 on nascent mRNA in the nucleus, before they reach the ribosomes and initiate translation in the cytoplasm.

Based on this study, and on previous ones revealing a role in mRNA degradation, the Rpb4/7 heterodimer has been coined as an “mRNA coordinator”, as this complex interacts with mRNA at each step of their life cycle; from transcription, translation to mRNA decay (Figure 1). However, these results raise questions concerning the function of this coordination between the transcription machinery, translation and mRNA decay. A key observation is that the role of Rpb4/7 in these processes is particularly important during environmental stress conditions, like heat stress and glucose starvation¹⁹. Indeed, while Rpb7 is an essential gene, Rpb4 is essential for transcription during temperature stress²². Furthermore, Rpb4 is known to mediate nuclear export of mRNA during stress conditions and most Rpb4 molecules accumulate in the cytoplasm during stress²³. Altogether, these data suggest a role for Rpb4/7 in integrating cellular response to environmental stress by acting on mRNA, from their synthesis in the nucleus to their translation and decay in the cytoplasm.

Spt4-Spt5 link transcription to cytoplasmic mRNA localization

Beside translation and mRNA decay, recent evidence point toward a novel role for the transcription machinery in promoting cytoplasmic mRNA localization. mRNA localization is a mechanism which restricts spatial and temporal mRNA translation in a cell. This process is essential for the establishment of cellular polarity, synaptic plasticity, asymmetric cell division

and cell fate determination²⁴. Evidence from several organisms suggests that the mRNA localization process is initiated on nascent mRNAs. For instance, the RNA-binding proteins ZBP1 and ZBP2, which are involved in β -actin mRNA localization at the leading edge in fibroblasts, are recruited on nascent β -actin mRNA^{25, 26}. Localization of the *oskar* mRNA at the posterior pole of *Drosophila* embryo requires members of the exon junction complex (EJC), like Y14-Mago and eIFIII^{27, 28}. While the assembly of the EJC takes place concomitantly with splicing and can occur cotranscriptionally, at least in mammalian cells²⁹, it is not clear yet if EJC assembly occurs cotranscriptionally in *Drosophila*. In both cases, it is still unclear if this recruitment is coupled to the transcription machinery, as it was shown for nuclear pre-mRNA processing pathways.

A link between transcription and mRNA localization has been more clearly established in the budding yeast, in which over 30 transcripts are actively transported and localized to the bud tip³⁰. mRNA localization to the bud depends on the RNA-binding protein She2, which forms with She3 and Myo4 a complex called the “locosome” that carries their cargo along the actin filaments to the bud tip³¹. She2 recognizes specific RNA motifs, called localization elements or zipcodes, present within the coding sequence or 3' untranslated region of localized transcripts³². While it was already known that She2 associates with mRNA in the nucleus³³, recent evidence have made clear that She2 is actively imported in the nucleus via a non-classical nuclear localization signal (NLS), and that disrupting nuclear import of She2 (by mutating its NLS or retaining it in the cytoplasm) perturb mRNA localization at the bud and asymmetric protein synthesis^{34, 35}.

A role for the transcription machinery in the cotranscriptional recruitment of She2 to nascent bud-localized transcripts has been recently revealed³⁶. Using chromatin

immunoprecipitation (ChIP), She2 was found to be associated with genes coding for bud-localized mRNA, in a transcription-dependent manner. Treatment with RNase or a mutation in the RNA-binding domain of She2 reduces its association with these genes, suggesting that She2 binds the nascent transcripts. Interestingly, She2 interacts *in vivo* with the elongating form of RNA polymerase II, raising the possibility that She2 may be recruited to chromatin via the transcription machinery. Indeed, She2 directly interacts with the transcription factor Spt4-Spt5, also known as DSIF, which is part of the transcription elongation complex³⁷. Spt4 and Spt5 form an heterodimeric complex which regulates the processivity of RNA pol II³⁸. Beside its role in elongation, Spt5 is also implicated in mRNA capping, as it interacts and activates the cap guanylyltransferase³⁹, and in mRNA splicing⁴⁰. Mutations in either *SPT4* or *SPT5* reduce the cotranscriptional recruitment of She2 on a gene coding for a bud-localized mRNA and disrupt its localization at the bud. This leads to a model in which Spt4-Spt5 serves as a “launching pad” which favors the cotranscriptional loading of She2 on nascent transcripts (Figure 2).

It is well understood that the cotranscriptional recruitment of mRNA processing factors imposes a temporal order on the different steps of pre-mRNA maturation (from 5' end capping to mRNA export) and mediates quality control of transcripts before nuclear export⁴. In comparison it is not yet clear what the advantages for the cotranscriptional loading of RNA-binding proteins regulating cytoplasmic events, like translation, mRNA localization or decay, could be. One possibility is that interactions with the transcription machinery may ensure that RNA-binding factors specifying the cytoplasmic fate of an mRNA are loaded before mRNA export. Evidence from yeast, *Drosophila* and vertebrate show that, in the absence of their mRNA localization factors or translational repressors, localized mRNA are still exported from

the nucleus^{27, 34, 41}. This suggests the absence of a nuclear quality control that would retain or degrade improperly loaded transcripts before their export to the cytoplasm, which would cause their premature translation, degradation or mislocalization. The cotranscriptional recruitment of factors which regulate the cytoplasmic fate of mRNA may help avoid this problem by loading these factors prior transcription termination.

Another possibility is that cotranscriptional recruitment allows an integration of different regulatory mechanisms before nuclear export of an mRNA. Rpb4/7 is a good example, as it regulates both mRNA translation and decay. It is also known that the presence of She2 in the nucleus is essential for the recruitment of the translational repressor Puf6 on the bud-localized *ASH1* mRNA in yeast³⁴. Cotranscriptional recruitment of She2 on nascent mRNA may favor the subsequent loading of Puf6, and ensure that translational control of bud-localized transcripts is established before their export to the cytoplasm. It will be of interest to determine if other pathways mediating the cytoplasmic fate of mRNA are also coupled with transcription, and to what extent the transcription machinery prime mRNA for translational regulation, localization or decay in the cytoplasm.

Acknowledgements

We thank Emmanuelle Querido for critical reading of the manuscript. This work was supported by the grant MOP43855 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to P.C. P.C is a Senior Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

1. Komili S, Silver PA. Coupling and coordination in gene expression: a systems biology view. *Nat Rev Genet* 2008; 9:38-48.
2. Pandya-Jones A, Black DL. Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA* 2009; 15:1896-908.
3. Tardiff DF, Lacadie SA, Rosbash M. A Genome-Wide Analysis Indicates that Yeast Pre-mRNA Splicing Is Predominantly Posttranscriptional. *Molecular Cell* 2006; 24:917-29.
4. Perales R, Bentley D. Cotranscriptionality : The Transcription Elongation Complex as a Nexus for Nuclear Transactions. *Mol Cell* 2009; 36:178-91.
5. Giorgi C, Moore MJ. The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:186-93.
6. Giorgi C, Moore MJ. The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007; 18:186-93.
7. Ujvari A, Luse DS. RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13:49-54.
8. Woychik NA, Young RA. RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol Cell Biol* 1989; 9:2854-9.
9. Edwards AM, Kane CM, Young RA, Kornberg RD. Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem* 1991; 266:71-5.
10. Jasiak AJ, Hartmann H, Karakasili E, Kalocsay M, Flatley A, Kremmer E, et al. Genome-associated RNA Polymerase II Includes the Dissociable Rpb4/7 Subcomplex. *J Biol Chem* 2008; 283:26423-7.

11. Rosenheck S, Choder M. Rpb4, a Subunit of RNA Polymerase II, Enables the Enzyme To Transcribe at Temperature Extremes In Vitro. *J Bacteriol* 1998; 180:6187-92.
12. Kimura M, Sakurai H, Ishihama A. Intracellular contents and assembly states of all 12 subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry* 2001; 268:612-9.
13. Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, et al. HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*; 39:912-24.
14. Selitrennik M, Duek L, Lotan R, Choder M. Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryot Cell* 2006; 5:2092-103.
15. Lotan R, Bar-On VG, Harel-Sharvit L, Duek L, Melamed D, Choder M. The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev* 2005; 19:3004-16.
16. Franks TM, Lykke-Andersen J. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* 2008; 32:605-15.
17. Lotan R, Goler-Baron V, Duek L, Haimovich G, Choder M. The Rpb7p subunit of yeast RNA polymerase II plays roles in the two major cytoplasmic mRNA decay mechanisms. *J Cell Biol* 2007; 178:1133-43.
18. Goler-Baron V, Selitrennik M, Barkai O, Haimovich G, Lotan R, Choder M. Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes Dev* 2008; 22:2022-7.

19. Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, Barkai O, Duek L, Choder M. RNA Polymerase II Subunits Link Transcription and mRNA Decay to Translation. *Cell* 2010; 143:552-63.
20. Hinnebusch AG. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* 2006; 31:553-62.
21. Brengues M, Teixeira D, Parker R. Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* 2005; 310:486-9.
22. Choder M. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:674-81.
23. Farago M, Nahari T, Hammel C, Cole CN, Choder M. Rpb4p, a Subunit of RNA Polymerase II, Mediates mRNA Export during Stress. *Mol Biol Cell* 2003; 14:2744-55.
24. Martin KC, Ephrussi A. mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell* 2009; 136:719-30.
25. Oleynikov Y, Singer RH. Real-Time Visualization of ZBP1 Association with β -Actin mRNA during Transcription and Localization. *Current Biology* 2003; 13:199-207.
26. Pan F, Huttelmaier S, Singer RH, Gu W. ZBP2 Facilitates Binding of ZBP1 to β -Actin mRNA during Transcription. *Mol Cell Biol* 2007; 27:8340-51.
27. Hachet O, Ephrussi A. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* 2004; 428:959-63.
28. Palacios IM, Gatfield D, St Johnston D, Izaurralde E. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2004; 427:753-7.

29. Custodio N, Carvalho, C., Condado, I., Antoniou, M., Blencowe, B. J., and Carmo-Fonseca, M. In vivo recruitment of exon junction complex proteins to transcription sites in mammalian cell nuclei. *RNA* 2004; 10:622-33.
30. Shepard KA, Gerber AP, Jambhekar A, Takizawa PA, Brown PO, Herschlag D, et al. Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:11429-34.
31. Paquin N, Chartrand P. Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in Cell Biology* 2008; 18:105-11.
32. Olivier C, Poirier G, Gendron P, Boisgontier A, Major F, Chartrand P. Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Mol Cell Biol* 2005; 25:4752-66.
33. Kruse C, Jaedicke A, Beaudouin J, Bohl F, Ferring D, Guttler T, et al. Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* 2002; 159:971-82.
34. Shen Z, Paquin N, Forget A, Chartrand P. Nuclear shuttling of She2p couples ASH1 mRNA localization to its translational repression by recruiting Loc1p and Puf6p. *Mol Biol Cell* 2009; 20:2265-75.
35. Du TG, Jellbauer S, Müller M, Schmid M, Niessing D, Jansen RP. Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO Reports* 2008; 9:781-7.
36. Shen Z, St-Denis A, Chartrand P. Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev* 2010; 24:1914-26.

37. Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, et al. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & Dev* 1998; 12:343-56.
38. Hartzog GA, Wada T, Handa H, Winston F. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev* 1998; 12:357-69.
39. Wen Y, Shatkin AJ. Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes & Dev* 1999; 13:1774-9.
40. Lindstrom DL, Squazzo SL, Muster N, Burckin TA, Wachter KC, Emigh CA, et al. Dual Roles for Spt5 in Pre-mRNA Processing and Transcription Elongation Revealed by Identification of Spt5-Associated Proteins. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1368-78.
41. Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Lorenz M, Dichtenberg J, Meng X, et al. Spatial regulation of beta-actin mRNA translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 2005; 438:512-5.

Figures

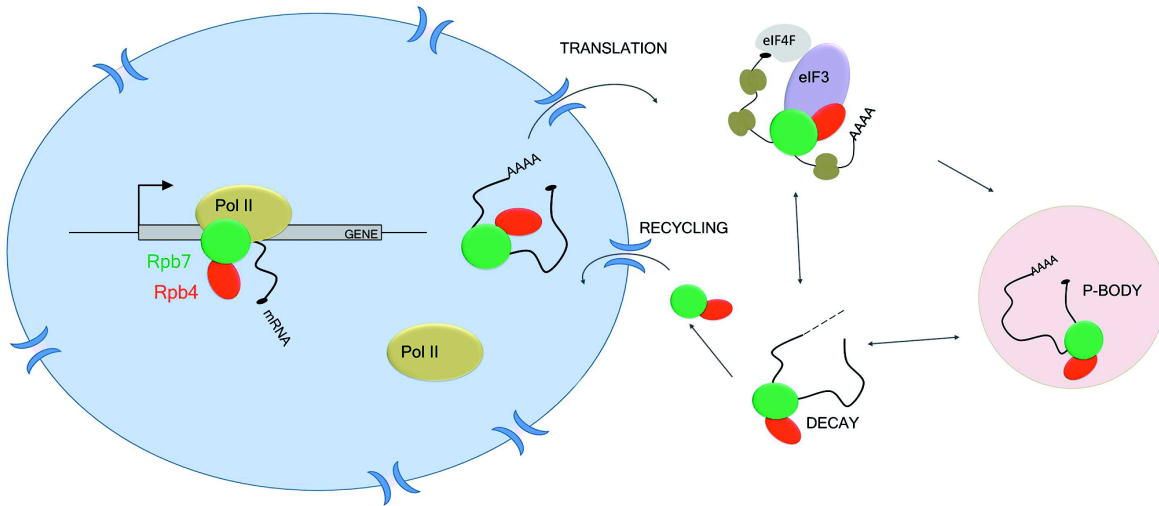


Figure 1: Rpb4/7 is involved in transcription, translation and mRNA decay. Rpb4/7 associates with the core RNA polymerase II (pol II) subunits during elongation and is loaded cotranscriptionally on specific transcripts. In the cytoplasm, Rpb4/7 recruits eIF3 and promotes translation initiation. During stress, Rpb4/7 follows mRNA to P bodies and favors the return of transcripts to polysomes after stress. In addition, Rpb4/7 can promote the degradation of its target mRNA, via polyA tail shortening, followed by exonuclease degradation. As Rpb4/7 actively shuttles between the nucleus and cytoplasm, it can be re-imported to the nucleus.

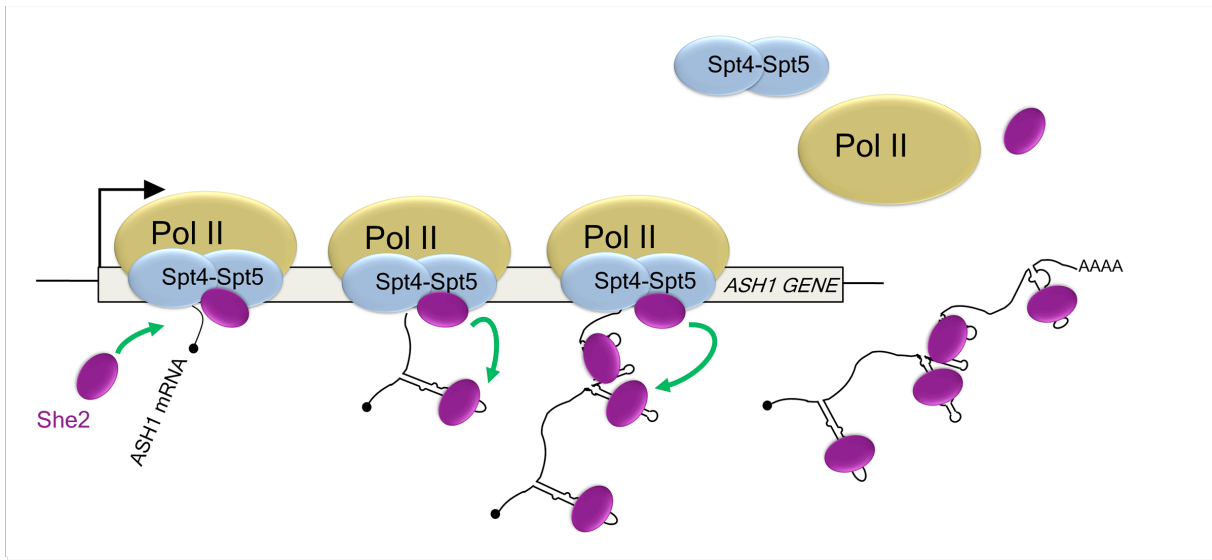


Figure 2: Spt4-Spt5 promote the cotranscriptional recruitment of She2 on the nascent *ASH1* mRNA. Interaction between She2 and Spt4-Spt5 on elongating RNA polymerase II (Pol II) favors the transfer of She2 on localization elements RNA as they emerge from the polymerase. The bud-localized *ASH1* mRNA contains four localization elements, which fold as stem-loop structures.

**Annexe 2 : Article publié dans le journal *Nucleic Acids Research*,
en ligne, le 20 juin 2014.**

**Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples
translational repression to mRNA localization**

Karen Shahbadian¹, Célia Jeronimo³, Amélie Forget¹, François Robert^{2,3}, Pascal Chartrand^{1*}

¹Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, ²Département de Médecine,
Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montréal, Qc, H3C 3J7,
Canada

³ Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal,
Qc, Canada

*To whom correspondence should be addressed.

ABSTRACT

Messenger RNA (mRNA) localization is coupled to the translational repression of transcripts during their transport. It is still unknown if this coupling depends on physical interactions between translational control and mRNA localization machineries, and how these interactions are established at the molecular level. In yeast, localization of transcripts like *ASH1* to the bud depends on the RNA-binding protein She2. During its transport, *ASH1* mRNA translation is repressed by Puf6. Herein, we report that She2 recruits Puf6 on *ASH1* co-transcriptionally. The recruitment of Puf6 depends on prior co-transcriptional loading of Loc1, an exclusively nuclear protein. These proteins form a ternary complex, in which Loc1 bridges Puf6 to She2, that binds the *ASH1* 3'UTR. Using a genome-wide CHIP-chip approach, we identified over 40 novel targets of Puf6, including several bud-localized mRNAs. Interestingly, the co-transcriptional recruitment of Puf6 on genes coding for these bud-localized mRNAs is also She2- and Loc1-dependent. Our results suggest a coordinated assembly of localization and translational control machineries on localized mRNAs during transcription, and underline the importance of co-transcriptional events in establishing the cytoplasmic fate of mRNAs.

INTRODUCTION

Localized and temporal control of protein production is one of the mechanisms which has evolved in eukaryotes to regulate events like asymmetric cell division, cell motility and synaptic plasticity (1). To this end, cells employ various and complex mechanisms to control both cytoplasmic localization of specific mRNAs and their local translation (2). While translational repression of mRNAs during their transport has been well established, it is still unclear if these two processes are co-regulated and if the assembly of translational repressors on localized mRNA is physically coupled to the localization machinery. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has emerged as a powerful model organism to study this question, since over twenty transcripts are transported from the mother cell and localized to the budding daughter cell (3). One of these transcripts, *ASH1*, is transported to the bud during late anaphase (4). The localization of *ASH1* depends on the co-transcriptional interaction of She2, the main RNA-binding protein involved in bud-localization of mRNAs, with four *cis*-acting elements (or zipcodes) along the mRNA sequence (5). After transcription, the mRNP complex is exported to the cytoplasm, where it is joined by She3 to make it stable and competent for localization (6). She3, on the other hand, bridges the mRNP complex to the molecular motor Myo4, which employs actin filaments to transport this localization complex, or “locosome”, to the bud (7).

Beside She2, other RNA-binding proteins like Puf6 and Loc1 have also been identified which are essential for complete localization of *ASH1* mRNA and local synthesis of Ash1. Puf6 was purified from She2-associated mRNPs and is a member of the Pumilio/FBF family of RNA-binding proteins (8). Puf6 directly binds in the 3' untranslated region (UTR) of *ASH1* mRNA and represses the translation of this transcript during its transport (8). Its

phosphorylation at the bud tip leads to translational activation and production of Ash1 (9). Loc1 also binds the *ASH1* mRNA 3'UTR and is important for localization and translational control of this transcript (10,11). However, the exact function of this protein is still unknown. Puf6 and Loc1 are mainly nucleolar proteins, suggesting that their interaction with *ASH1* mRNA might take place in the nucleus. Indeed, it was shown that presence of She2 in the nucleus is essential for the association of Puf6 and Loc1 with *ASH1* mRNA and for the translational repression of *ASH1* (12,13). Both Puf6 and Loc1 are thought to be recruited post-transcriptionally during a nucleolar transit of the *ASH1* mRNA mediated by She2 (12). However, both Puf6 and Loc1 are also associated with the transcription elongation factor Spt5 *in vivo* (14), suggesting that Puf6 and/or Loc1 may instead be loaded on mRNA during transcription.

In this study, we used chromatin immunoprecipitation (ChIP) to investigate the recruitment of Puf6 and Loc1 on the *ASH1* mRNA and elucidate the interactions between She2, Puf6 and Loc1. We show that both Puf6 and Loc1 interact with nascent *ASH1* mRNA during transcription and that they require She2 for their co-transcriptional association with this mRNA. We also found that Puf6, Loc1 and She2 form a ternary complex *in vitro* and *in vivo*, and that Loc1 links Puf6 to She2 in this ternary complex. Deletions of Loc1 that disrupt its interaction with She2 result in defective Ash1 sorting to the daughter cell. These findings describe a novel role for Loc1 in physically coupling translational control to the mRNA localization machinery. Finally, using a genome-wide ChIP-chip approach, we detected the co-transcriptional loading of Puf6 on several new mRNA target, including known bud-localized mRNAs, and we show that the recruitment of Puf6 on these transcripts is both She2-

and Loc1-dependent. Overall, our results suggest a cooperative recruitment of mRNA localization and translational control factors during the transcription of localized mRNAs.

METHODS

Yeast strain and DNA manipulation

All yeast strains in this study are derivative of BY4741. Yeast growth was performed in YPD or synthetic selective media at 30°C. PCR based gene disruption and protein tagging was performed as described previously (15). Gene disruptions were all confirmed by PCR analysis of genomic DNA. For mutagenesis of Puf6 binding sites (2X UUGU), a two-step PCR based mutagenesis method was used. Mutated PCR product was cloned into the integrative plasmid YIP128, and the resulted plasmid linearized with EcoRV and transformed into an *ash1* strain. Strains used are listed in Supplementary Table S1.

Plasmid construction

To construct YCP111-She2MYC and YCP111-She2R63KMYC, She2MYC and She2R63KMYC were PCR amplified from YCP22-She2MYC and YCP22-She2R63KMYC, and cloned into PstI/KpnI sites of YCP111. pGEX-6P1-Loc1 was generated by cloning PCR amplified Loc1 coding sequence into BamHI/NotI sites of pGEX-6P1. pGEX-4T3-Puf6-His was created by amplifying the Puf6 sequence from genomic DNA with primer pairs in which reverse primer contained coding sequence for six histidines. The PCR fragment was then cloned into SalI/NotI sites of pGEX-4T3. YIP128-*ASH1* 3'UTR mutated was constructed by cloning the PCR fragment containing the mutated Puf6 binding sites into the YIP128 BamHI/XmaI sites. To construct pGEM4Z1+mE3, a PCR was performed on genomic DNA from a strain with mutated *ASH1* 3'UTR. The PCR product was then cloned into the

HindII/EcoRI sites of the pGEM4Z1 plasmid. Plasmids YCP111-*LOC1*-C1 to C5 are derived from plasmid pRL093, which contains the entire *LOC1* open reading frame with 500bp of 5' and 1000bp of 3' region, and six myc epitopes inserted at a BamHI site just before the stop codon of *LOC1* (10). First, pRL093 was digested with PstI and SmaI, and the resulting fragment containing the *LOC1* gene was cloned in YCPlac111. The *LOC1* open reading frame with its 5' sequence was amplified from genomic DNA using primers containing a PstI restriction site on forward primer and three HA tags along with a BamHI restriction site on the reverse primer, to generate the *LOC1*-C1 construct. To generate the *LOC1*-C2 and C3 deletions, the same strategy was used, with the exception that the reverse primers were positioned at +450 and +300 nucleotides from the ATG, respectively. The constructs *LOC1*-C4 and C5 were generated using a two-step PCR strategy, in which the promoter region of *LOC1* was fused to PCR fragments positioned either at +150 or +300 from the ATG, respectively. These PCR products were subsequently cloned in YCPlac111-*LOC1*-C1 digested with PstI and BamHI. The sequences of all cloned DNA were verified by Sanger capillary sequencing. Plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S2.

Chromatin immunoprecipitation

For each ChIP, three independent 50 ml early log phase culture was used. All strains were grown in YPD, except for the strain expressing She2WT and She2R63K from YCPlac111, for which selective -leu medium was used. To increase the number of *ASH1* transcripts, cells were synchronized for 2h using Nocodazole at the final concentration of 15µg/ml. Cells were cross-linked for 5 minutes at room temperature using formaldehyde at a final concentration of 1%. For quenching of formaldehyde, glycine was added at a final concentration of 0.125M. Cells were harvested by centrifugation (3000g, 5min, 4°C) and washed twice with cold PBS,

then resuspended in 1 ml FA lysis buffer (50mM Hepes/KOH pH7.5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton, 0.1% Sodium Deoxycholate, 40 U RNasin/mL (Promega), 88 µg/mL PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin, 5 µg/mL aprotinin) and lysed using glass beads by vortexing 5 times 30 sec with 1 min interval on ice. When RNase treatment was needed, RNase A (4 Kunitz units; Sigma) was added to the lysate. Lysed cells were transferred to a new 1.5 ml microtube and sonicated for three times each 20 sec. followed by 1 min on ice using 100 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Debris were removed by centrifugation (16000g, 5min, 4°C) and solubilized chromatin was transferred to a new microtube in order to perform immunoprecipitation. Before IP, a 50µl aliquot of solubilized chromatin was removed and stored at -20°C as “input”. Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C using 3µg of each of the following antibodies: total rabbit IgG (Sigma) for TAP-tagged proteins; mouse monoclonal 9E10 antibody (Roche Applied Science) for myc-tagged proteins and 8WG16 monoclonal antibody (Abcam) for immunoprecipitation of RNA Pol II. Immunocomplexes were collected for 4h at 4°C using 50 µl protein A/G sepharose beads (GE Healthcare). Beads were washed with 700µl FA lysis buffer, 1ml of FA 500 buffer (50 mM HEPES/KOH at pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate, 40 U RNasin/mL), 700 µl of LiCl wash (10 mM Tris-Cl at pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5% [v/v] NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA), and finally 700 µL of TE/100 mM NaCl . Chromatin was decross-linked and eluted from the beads by heating the beads overnight at 65°C in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, and 0.5% SDS. After treatment with 1 mg/ml of Proteinase K (Roche) at 37°C for 2h, chromatin was phenol extracted and ethanol precipitated and resuspended in 40µl of TE buffer.

Quantification of the immunoprecipitated and “input” DNA was performed by quantitative real-time PCR by (LightCycler 480 Roche Applied Science) using SsoFast EvaGreen Supermix q-PCR kit (Biorad). Each 20ul PCR reaction contained 10ul of qPCR mix, 2ul of DNA, and 300nM of each of the primers. PCR was performed in the following conditions: enzyme activation for 30 sec at 95°C, followed by 40 cycles of 5 sec at 95°C, 20 sec at 57°C for annealing and extension step. Cycle thresholds (Ct) for each triplicate of sample and input were averaged and ChIP enrichment was calculated by dividing the amount of ChIP DNA over input DNA using $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formula. Background represents an amplicon from an intergenic region between the genes YDR539W and YDR540C on Chromosome IV. For ChIP of Rpb1, an amplicon on *SCR1* was used as background. Primers used for ChIP are listed in Supplementary Table S3.

Chromatin immunoprecipitation-microarrays (ChIP-chip)

ChIP-chip experiments were performed after crosslinking cells with 1% formaldehyde for 30 minutes as described previously (16), with the following modifications. Puf6 was immunoprecipitated from a strain expressing Puf6-TAP from the *PUF6* endogenous locus. The isogenic non-tagged strain was used as control. Immunoprecipitation was done using 0.5 mg of Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) per IP, pre-coupled with rabbit IgG (Sigma) at the concentration of 350ug of IgG/mg of beads, as per manufacturer’s recommendation. In order to preserve interactions mediated via RNA, 40 units/ml of RNaseOUT (Life Technologies) was included in the lysis buffer.

Peak calling

Significant regions were identified using the algorithm described in (17). The parameters used were as follow: ProbeSetPvalue=0.0005, Filter1Pvalue=0.0005, Filter2Pvalue=0.0005-0.005.

This allowed for the identification of 121 regions, overlapping with 117 genes (105 if not counting dubious genes). Each gene was manually curated by two different individuals. After removing dubious and uncharacterized ORFs, targets with ambiguous gene assignments (due to proximal neighbouring genes) and genes with no probe enriched at least two fold, a list of 43 target genes were retained for further analyses.

Co-Immunoprecipitation

Yeasts were grown in 100 ml YPD at 30°C to the log phase. Cells were harvested by centrifugation (3000g, 5 min, 4°C) and resuspended in 800 µl of lysis buffer (20mM Hepes pH7.5, 20% glycerol, 150mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.05% NP-40, 0.1 M beta-Mercaptoethanol). Cells were lysed by vortexing in presence of glass beads for five times 30 sec with an interval of 1min on ice. After centrifugation (16000g, 5 min, 4°C), the supernatant was transferred to new microtube for performing immunoprecipitation. For Puf6-TAP immunoprecipitation, 5µg of total IgG (Sigma) was added to lysates and incubated 4h at 4°C, then 50 µl of Protein G sepharose beads (GE healthcare) was used for the collection of immunocomplexes. Beads were washed three times with wash buffer (20mM Hepes pH7.5, 20% glycerol, 200mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.05% NP-40), and immunocomplexes were eluted from the beads by heating the beads for 10 min at 95°C in 100 µl of 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS.

Protein purification

Recombinant She2-GST and Loc1-GST over-expression was performed in *Escherichia coli* BL21 cells transformed with pGEX-6P1-She2 and pGEX-6P1-Loc1 plasmids respectively. For overproduction of Puf6-GST-His, pGEX-4T3-Puf6-His plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta cells. Cells were grown in Luria-Bertani (LB) to the mid-log phase and protein

induction was performed overnight at 15°C using 1mM final concentration of IPTG. Cells were harvested by centrifugation (15000g, 15 min, 4°C) and resuspended in Tris 50mM pH8, 5mM EDTA, 1M NaCl, complete protease inhibitor cocktail (Roche), 1mg/ml lysozyme and RNase A at 15ug/ml final concentration. Lysate was incubated on ice for 30 min, and then sonicated. Soluble proteins were separated from debris by centrifugation (16000g, 15 min, 4°C) and supernatant was used for affinity chromatography with glutathione sepharose beads (GE healthcare). Beads were washed four times with wash buffer (Tris 50mM pH8, 5mM EDTA, 1.5M NaCl). Proteins were eluted from beads using reduced glutathione (Sigma) at a final concentration of 10mM in PBS. Whenever needed, GST tag was cleaved by either PreScission protease (GE healthcare) (for She2-GST and Loc1-GST) or Thrombin (GE healthcare) for Puf6-GST, following instructions provided by manufacturer. For Pug6-GST-His, a second round of purification with His-tag was performed to eliminate unspecific contaminants from glutathione beads purification. After purification by Ni-NTA agarose beads (Qiagen), proteins were eluted from beads using imidazole at a final concentration of 250mM.

***In vitro* transcription**

Using T7 RNA polymerase (Promega), E3, E1 and mE3 RNAs were transcribed *in vitro* from linearized plasmids pRL168, pGEM4Z1-E1 and pGEM4Z1-mE3, respectively. RNA was phenol extracted and ethanol precipitated and stored in DEPC H₂O at -80°C.

***In vitro* pull-down experiments**

For the interaction between Loc1-GST:She2 and Puf6-GST:She2:Loc1, first GST-tagged proteins Loc1-GST and Puf6-GST were bound to glutathione beads then equimolar quantities of each of the proteins were added to the binding reaction in binding buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2mM EDTA, 1mM DTT, and 5% glycerol).

Reaction was incubated for 4h at 4°C then washed three times with binding buffer. The protein complex was eluted from the beads by heating at 95°C in Laemmli buffer and then separated on 10% SDS-PAGE.

For *in vitro* reconstitution experiments, physiological concentration of each of the proteins was used (see text). First, *in vitro* transcribed RNA was denatured by heating at 65°C for 10 min following by a rapid cooling on ice. RNA was renatured for 15min at room temperature then incubated with She2 at 4°C for 30min, in binding buffer in presence of Heparin at final concentration of 1µg/µl. The She2:RNA complex was added to Puf6-His bound to the Ni-NTA agarose beads. When Loc1 was part of the complex, Puf6-His bound to the beads was incubated with Loc1 in binding buffer for 4h at 4°C to form Puf6:Loc1 complex prior to the addition of She2:RNA complex. For the interaction of Puf6-His with RNA, Puf6-His bound to the beads was added directly to renatured RNA. Beads were washed three times in binding buffer and the reactions were aliquoted in two tubes, one part was used for analysing eluted proteins by heating beads in Laemmli buffer at 95°C, and the other aliquot was used for purification of pulled-down RNA by heating beads at 65°C in 100 µl of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, and 1% SDS. For RNA gel, a denaturing 8% PAGE was used, followed by GelRED staining.

Northern blotting

To extract RNA from yeast, 50 ml of yeast cells in YPD were grown to log phase and harvested by centrifugation (3000g, 5min, 4°C). Yeast pellet was resuspended in 1ml cold water and transferred to a 1.5 ml microtube. After centrifugation (3000g, 5min, 4°C), the pellet was resuspended in 400ul TES solution (10mM Tris-Cl pH7.5, 10mM EDTA, 0.5 %SDS) then 400ul acid phenol was added and incubated at 65°C for 1h. After centrifugation (16000g, 10

min, 4°C), 400ul chloroform was added to the supernatant. After centrifugation (16000g, 10 min, 4°C), RNA was ethanol precipitated from supernatant and resuspended in 50ul H₂O. For Northern blotting, 15µg of total RNA was separated on a 1.5% denaturing agarose gel containing formaldehyde for 4h in MOPS-EDTA buffer. RNAs were transferred on Nylon membrane (GE healthcare) using capillary blotting. RNAs were UV cross-linked and hybridized with specific *ASH1* probe at 65°C in Church hybridization buffer (1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ pH 7.2, 7% SDS). *ASH1* probe was internally labeled by [α -³²P] dCTP using Ready-To-Go DNA Labeling Beads (Amersham). *SCR1* probe was an end labeled oligonucleotide, complementary to the middle of *SCR1* sequence, labeled by [γ -³²P] ATP using T4 polynucleotide kinase.

RESULTS

Puf6 and Loc1 are recruited on *ASH1* mRNA during transcription

We have recently shown that the She2 localization factor is loaded co-transcriptionally on nascent *ASH1* mRNA (5). Previous studies have also shown that the presence of She2 in the nucleus is essential for recruitment of nucleolar proteins Puf6 and Loc1 on *ASH1* mRNA (12,13). These results raised the hypothesis that She2 may recruit Puf6 and Loc1 during transcription of *ASH1*. To test this possibility, chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed using a strain expressing an endogenous C-terminal TAP-tagged Puf6. In this assay, chromatin associated with Puf6 was immunopurified, and the enrichment of specific regions of the *ASH1* gene was measured by quantitative PCR (qPCR). Two specific amplicons from the *ASH1* gene were analyzed: one corresponding to the localization element E3, which contains the Puf6-binding domain, and one corresponding to the E1 localization element, as an

internal negative control (Figure 1A). As shown in Figure 1B, the E3 amplicon was specifically enriched after Puf6 ChIP, while there was no enrichment for the E1 amplicon, suggesting an association of Puf6 with the E3 element on the *ASH1* gene. To determine whether this association is direct or mediated via the nascent *ASH1* RNA, chromatin was treated with RNase prior to Puf6 immunoprecipitation. As expected, enrichment of chromatin near element E3 was abolished after RNase treatment, suggesting a co-transcriptional recruitment of Puf6 on nascent *ASH1* mRNA and validating that our ChIP protocol efficiently detects RNA-mediated binding events (Figure 1B).

The same approach was used to determine whether Loc1 is also recruited co-transcriptionally on the *ASH1* mRNA. Results from three-hybrid assays suggest that Loc1 interacts with localization elements E1 and E3 of the *ASH1* mRNA (10). Therefore after ChIP in a Loc1-TAP strain, the enrichment of three amplicons on the *ASH1* gene was quantified: two amplicons near the localization elements E1 and E3, and one near the element E2B, which serves as an internal negative control (Figure 1A). Chromatin from both elements E1 and E3 was specifically enriched after Loc1-TAP ChIP, but not from the element E2B (Figure 1C). However, a stronger signal was observed at localization element E3, suggesting that Loc1 interacts primarily with this region of the *ASH1* gene. After repeating ChIP in the presence of RNase, Loc1 ChIP signal disappeared for all the regions of *ASH1* (Figure 1C), suggesting an RNA-dependent enrichment of Loc1 on the *ASH1* gene.

Since She2 is important for Loc1 and Puf6 binding to the *ASH1* mRNA in the nucleus (13), the role of She2 in the co-transcriptional recruitment of Puf6 and Loc1 on the *ASH1* gene was tested by ChIP in a *she2* background. For both Puf6 and Loc1, a strong decrease in the enrichment of amplicon E3 after ChIP was observed in *she2* strains compared to wild-type

(Figure 1B and C). Decrease of the element E1 amplicon was also observed after Loc1 ChIP in the *she2* background. These results suggest that She2 is necessary for the recruitment of both Puf6 and Loc1 on the nascent *ASH1* mRNA. Since Puf6 and Loc1 interact *in vivo* (11), the interdependency between Puf6 and Loc1 in their recruitment on *ASH1* was also tested. Surprisingly, a threefold decrease of Puf6 ChIP signal on the *ASH1* E3 element was observed in a *loc1* strain (Figure 1B), suggesting that Puf6 recruitment is dependent on Loc1. Moreover, when Puf6 ChIP was performed in a *she2 loc1* strain, no enrichment of *ASH1* E3 region was observed (Figure 1B), showing that Puf6 requires both She2 and Loc1 for its recruitment on the nascent *ASH1* mRNA. Concerning Loc1, while its enrichment on E3 element in a *puf6* strain decreased significantly, still nearly 70% of wild-type (WT) enrichment was observed. A reduction was also observed for the association of Loc1 with the E1 element in a *puf6* background (Figure 1C).

To eliminate the possibility that the observed decrease in ChIP signals of Puf6-TAP and Loc1-TAP in the different mutants was caused by an alteration in *ASH1* mRNA abundance, RNA polymerase II occupancy on the *ASH1* gene was measured in the various mutants by performing ChIP of Rpb1, the largest subunit of the RNA polymerase II. No significant differences were observed in Rpb1 ChIP enrichment along the *ASH1* gene in *she2*, *loc1* or *puf6* strains, compared to WT (Supplementary Figure S1A), suggesting that *ASH1* transcription is not affected in these mutants. Northern blot on RNAs extracted from *she2*, *loc1*, *puf6* and *she2 loc1* strains also confirmed that *ASH1* mRNA levels did not vary between these mutants (Supplementary Figure S1B). Moreover, western blot analysis confirmed that Puf6-TAP and Loc1-TAP expression was similar in mutants and WT strains (Supplementary Figure S1C). Altogether, these results show that Puf6 and Loc1 are loaded on the 3'UTR of

the nascent *ASH1* mRNA during its transcription. Interestingly, the loading of Loc1 depends on She2, while the loading of Puf6 depends on both She2 and Loc1, suggesting a stepwise assembly of these factors on the nascent transcript.

She2 RNA-binding and PUF binding-element are important for the recruitment of Puf6 on nascent *ASH1* mRNA

The results presented above suggest that She2 promotes the recruitment of Loc1 and Puf6 on nascent *ASH1* mRNA. To further confirm the primary role of She2 in this recruitment, ChIP of She2-myc in WT, *loc1* and *puf6* strains was performed. No significant differences were observed for the enrichment of She2 on the localization element E3 of *ASH1* gene in mutant versus WT strains (Supplementary Figure S2), suggesting that She2 interacts with the nascent *ASH1* E3 localization element independently of Loc1 and Puf6. She2 is an RNA-binding protein which directly interacts with stem-loop structures in *ASH1* localization elements (18). Moreover, She2 is associated with the transcription elongation factor Spt4-Spt5 before its recruitment on the localization elements of *ASH1* (5). To investigate which of these capacities of She2 is important for the recruitment of Loc1 and Puf6, a mutant of She2 (She2R63K) that lacks the ability to bind RNA, but preserves its interaction with Spt4-Spt5 was tested (5). Puf6-TAP *she2* and Loc1-TAP *she2* strains were transformed with centromeric plasmids expressing either WT She2-myc or mutant She2R63K-myc, ensuring endogenous expression level of She2. ChIP of Puf6-TAP and Loc1-TAP was performed, and enrichment of the E3 amplicon was determined by qPCR. For both Puf6 and Loc1 ChIPs, more than twofold decrease in the enrichment level of E3 was observed when the mutant form of She2 was expressed (Figure 1D), suggesting that the recruitment of Puf6 and Loc1 on the nascent E3 localization element relies on the RNA-binding capacity of She2.

Puf6, like other members of the Puf family of proteins, is an RNA-binding protein and recognizes two UUGU tetranucleotides sequences near the localization element E3 in the 3'UTR of *ASH1* (8). These sequences are important for *in vivo* association of Puf6 with *ASH1* mRNA, and asymmetrical distribution of Ash1 (8). To determine whether the Puf6-binding site is necessary for the co-transcriptional recruitment of Puf6, the two UUGU elements located in the 3'UTR of *ASH1* mRNA were mutated to AACA (Figure 1E). Either the WT or mutated *ASH1* gene were integrated at the *LEU2* locus of a Puf6-TAP *ash1* yeast strain. Puf6-TAP CHIP was performed on mutated and WT *ASH1* 3'UTR strains, which revealed a more than twofold decrease in the enrichment of Puf6-TAP on the mutated E3 localization element compared to WT 3'UTR (Figure 1E). Altogether, these results suggest that Puf6 requires its binding element, and not only She2, in order to be properly loaded on *ASH1* mRNA during transcription.

Puf6, Loc1 and She2 form a ternary complex

Our results thus far suggest a model in which the interaction of She2 with the *ASH1* mRNA during transcription leads to the recruitment of Loc1 and Puf6 on the E3 localization element. However, direct interaction between these proteins has yet to be reported. To explore possible direct protein interactions among these factors, GST pull-down experiments using recombinant proteins were performed. First, recombinant Loc1-GST and She2 were purified from bacteria and tested for their co-elution from glutathione beads. As shown in Figure 2A, She2 was pulled-down from beads containing Loc1-GST but not GST alone, suggesting a direct interaction between She2 and Loc1 *in vitro*. Next, interactions between Puf6-GST and Loc1 or She2 were assessed (Figure 2B). Incubation of Puf6-GST with Loc1 led to the co-elution of the two proteins, indicating a direct Puf6:Loc1 interaction. In contrast, when Puf6-

GST and She2 were incubated together, no co-elution was observed, suggesting that there is no direct interaction between Puf6-GST and She2 (Figure 2B). However, when Puf6-GST and She2 pull-down was repeated in presence of Loc1, the complex of three proteins was retained on the beads, showing that Puf6 and She2 form a ternary complex with Loc1 *in vitro*, with Loc1 acting as a bridge between the other two factors.

By revealing this direct interaction between Loc1 and She2, we sought to rule out any possible defect of She2-Loc1 interaction due to the She2R63K mutation in the ChIP experiments presented in the Figure 1D. To this end, recombinant She2(WT)-GST and She2(R63K)-GST were purified from bacteria and their interaction with Loc1 was tested in a GST pull-down assay. As shown in Supplementary Figure S3, the same amount of Loc1 was copurified from either WT or R63K mutant She2-GST, confirming that this mutation has no effect on the She2-Loc1 interaction.

In order to confirm the role of Loc1 in the formation of a She2-Loc1-Puf6 complex *in vivo*, co-immunoprecipitation experiments using Puf6-TAP and She2-myc were performed. Pull-down of Puf6-TAP led to co-purification of She2-myc (Figure 2C), confirming the interaction between these factors *in vivo* (8,13). However, immunoprecipitation of Puf6-TAP in a *loc1* strain did not result in enrichment of She2-myc in the pellet (Figure 2C), confirming that Loc1 is necessary to bridge Puf6 to She2 *in vivo*. To confirm the interaction between Puf6 and Loc1 *in vivo*, and to determine the role of She2 in this interaction, co-immunoprecipitation was repeated on endogenous Puf6-TAP and Loc1-HA, in either WT or *she2* strains. After immunoprecipitation of Puf6-TAP, Loc1-HA was present in the immunopellet either in presence or absence of She2, suggesting that She2 is not necessary for the interaction between Puf6 and Loc1 (Figure 2D). Altogether, these results show that She2, Loc1 and Puf6 form a

ternary complex *in vitro* and *in vivo*, and these data point toward a role for Loc1 in bridging Puf6 to She2.

***In vitro* reconstitution of E3 localization element mRNP complex**

Although our ChIP results provide evidence for the formation of a multiprotein complex on the *ASH1* E3 element during transcription, these data do not prove that such complex really assemble. In order to determine whether a Puf6-Loc1-She2 ternary complex can be formed on the *ASH1* E3 RNA *in vitro*, pull down experiments were performed in presence of a 118 nt E3 localization element RNA using physiological concentration of each protein: 230 nM of She2 (19), 200nM of Loc1 and 1.2 μ M of His-tagged Puf6 (20). The E3 localization element RNA was first incubated with She2, then added to the Puf6-His:Loc1 complex bound to Ni-NTA agarose beads. The Puf6-His:Loc1:She2 complex was co-eluted along with E3 RNA, suggesting that the mRNP complex can be formed *in vitro* (Figure 3A, lane 2). When Loc1 was omitted from the reaction, She2 and the E3 RNA were still co-purified with Puf6-His (Figure 3A, lane 4), suggesting that Puf6 and She2 can also interact via their simultaneous binding to the localization element E3 RNA (6). Finally, in the absence of both She2 and Loc1, Puf6-His was still able to bind the E3 RNA (Figure 3A, lane 6), as previously reported (8).

To further confirm that Puf6 can be recruited on the E3 RNA via its interaction with the Loc1:She2 complex, a mutated version of E3 RNA (mE3), in which the two UUGU sequences that constitute the Puf6-recognition motif were mutated to AACA, was produced *in vitro*. Since the She2-binding element in the mE3 RNA is preserved, this RNA can still bind to She2, but not to Puf6. As expected, the mE3 RNA was not associated with Puf6-His in the pull-down assay in the absence of She2 and Loc1 (Figure 3B, lane 6). However, when pull-

down of the Puf6-His:Loc1:She2 ternary complex with this mutated RNA was repeated, the mRNP complex was retained on the beads (Figure 3B, lane 2), suggesting that the RNA-binding affinity of She2 for the mE3 RNA is sufficient to join the Puf6-His:Loc1:She2 protein complex to this RNA. Therefore, one would expect that in the absence of Loc1, the Puf6-His:Loc1:She2 ternary complex would not form, and neither She2 nor the mE3 RNA would bind to Puf6-His. Indeed, when Loc1 was not present in the reaction (Figure 3B, lane 4), both She2 and mE3 RNA were poorly retained on Puf6-coupled beads (compare lane 4 versus lane 2), confirming the role of Loc1 in bridging Puf6 to the She2-mE3 RNA complex.

In order to validate the specificity of the She2-Loc1-Puf6 ternary complex for the E3 element in our *in vitro* assay, its interaction with another *ASH1* localization element (E1) was also tested. Since She2 possesses a lower affinity for the E1 localization element compared to the E3 element (6), and since the E1 RNA does not contain any Puf6-binding motif, this RNA should bind poorly to the ternary complex at the concentration of She2 used in our pull down experiments. For this experiment, a 70nt RNA corresponding to the minimal localization element E1 (18) was *in vitro* transcribed and used in the pull-down assay. No E1 RNA was co-eluted with the Puf6-His:Loc1:She2 complex (Supplementary Figure S4), suggesting that E1 RNA does not interact with this ternary protein complex, in accordance with ChIP data on Puf6-TAP (Figure 1B). Altogether, these results show that a She2-Loc1-Puf6 ternary complex can assemble on the localization element E3, via interactions between this RNA with both She2 and Puf6.

The interaction between Loc1 and She2 is essential for proper localization of *ASH1* mRNA

Thus far, our results revealed interactions between various proteins involved in *ASH1* mRNA localization and translational control. To explore whether these interactions are important for proper localization of *ASH1* mRNA, the interaction between Loc1 (the bridging protein in the complex) and She2 was disrupted using various deletion mutants of Loc1. These deletions were fused to three HA tags and cloned in a centromeric plasmid under the control of the *LOC1* promoter (Figure 4A). The resulting plasmids were transformed into a *loc1* strain in which She2 is myc tagged. Proper expression of each Loc1 deletion construct was confirmed by western blot (Supplementary Figure S5). Using these strains, co-immunoprecipitation assays were performed to detect the interaction between the various Loc1-HA constructs and She2-myc *in vivo*. Loc1-HA constructs (C1 to C5; Figure 4A) were immunoprecipitated using anti-HA monoclonal antibody and the presence of She2-myc in the immunocomplex was measured by western blot. As shown in Figure 4B, She2-myc was immunoprecipitated along with all Loc1-HA constructs. However, after quantification of the amount of She2-myc protein present in the immune-pellets, the constructs Loc1 C3 and C5 showed dramatic reduction of the co-precipitated She2-myc protein compared to wild-type Loc1 (Figure 4B). These results reveal that the deletion of either half of Loc1 reduces its interaction with She2.

The Loc1-HA constructs were further tested for their effect on *ASH1* mRNA localized translation using a yeast genetic assay originally developed by Jansen and colleagues to identify the *SHE* genes (21). In this assay, the asymmetric distribution of the Ash1 protein and *HO* promoter activity was assessed using the yeast strain K4452 *loc1*, in which the *ADE2* gene is under the control of the *HO* promoter and which contains a deletion of the *LOC1* gene. In

this strain, symmetric distribution of Ash1 between mother and daughter cells (due to defective *ASH1* mRNA localization and/or translation) leads to repression of the *ADE2* gene and poor growth on plate lacking adenine (-Ade). If Loc1 function is restored, Ash1 accumulates in the daughter cell, so expression of the *ADE2* gene in the mother cell allows growth on -Ade plates (Figure 4C). When transformed with a plasmid expressing the wild-type Loc1-HA (construct C1; Figure 4A), the K4452 *loc1* strain grew on -Leu -Ade plates, while the same strain transformed with the empty vector grew poorly (Figure 4C). Interestingly, a slower growth on -Leu -Ade of K4452 *loc1* expressing the C3 and C5 Loc1-HA constructs was observed compared to the other deletions, suggesting that these deletions disrupt Ash1 sorting. Altogether, these results suggest that the interaction between Loc1 and She2 is important for proper *ASH1* mRNA localized translation and Ash1 asymmetric distribution.

Genome-wide identification of Puf6 interacting transcripts

Results presented above show that She2 physically interacts with Puf6 via Loc1 to recruit these two factors on the *ASH1* 3'UTR during transcription. Are other yeast transcripts regulated by this pathway or is this mechanism unique to *ASH1*? Previous studies have shown that Puf family proteins (Puf1-5) interact with approximately 12% of the protein coding mRNA in yeast (22). However, beside the *ASH1* mRNA, no other transcript is known to be regulated by Puf6 (8). To identify genes associated with Puf6, a genome-wide approach was used, based on ChIP-chip assay. Using a strain expressing endogenous TAP-tagged Puf6 protein, Puf6 ChIP was performed, chromatin was amplified and analyzed by tiling arrays which covers the entire yeast genome. Using this method, a total of 121 genomic regions were identified as occupied by Puf6. From these sites, 43 ORFs could be unambiguously assigned

as being associated with Puf6 and were used in our analyses (Supplementary Table S4). Figure 5A represents the specific enrichment of Puf6 on its targets in the form of a heat map. Genes were either aligned on their transcription start site (TSS; top panel) or on their polyadenylation signal site (pA; bottom panel). Puf6 enrichment in most of the identified ORFs reaches its maximum towards the end of the gene but before the stop codon (orange marks), suggesting that Puf6 tends to bind before the 3'UTR.

Gene Ontology analysis for processes, functions and components reveals that most Puf6-associated targets encode for proteins localized to the cell periphery and are involved in cell wall biosynthesis and organization (Figure 5B). The list of newly identified genes also includes 5 out of 24 mRNAs which were shown to interact with She2 and localize to the yeast bud (Figure 5C) (3), suggesting that Puf6 plays an important role in the translational regulation of other bud-localized mRNAs ($p = 4.8 \times 10^{-7}$). The interaction of Puf6 with two bud-localized transcripts, *MID2* and *SRL1*, was validated by ChIP-qPCR. Figure 6A represents genomic snapshots of Puf6 enrichment at these two genes, based on our ChIP-chip data. ChIP of Puf6-TAP was performed and enrichment of specific amplicons on *MID2* and *SRL1* genes was quantified by qPCR. As shown in Figure 6B, ChIP of Puf6 generated specific signal for both genes, confirming interaction of Puf6 with these genes *in vivo*. After treatment with RNase, the ChIP signal was abolished (Figure 6B), suggesting that Puf6 interacts with these genes in a co-transcriptional manner. Finally, to explore the dependency of Puf6 recruitment on She2 and Loc1, ChIP was performed in Puf6-TAP *she2* and Puf6-TAP *loc1* strains. A significant decrease in Puf6 enrichment was observed on both genes compared to the WT strain (Figure 6B), confirming that the recruitment of Puf6 on *MID2* and *SRL1* is She2- and Loc1-dependent.

DISCUSSION

The current paradigm in the field of mRNA localization posits that mRNA localization is coupled to the translational repression of transcripts during their transport (23). While some RNA-binding proteins, such as ZBP1, combine both localization and translational repression activities (24), in most cases, the two are performed by independent *trans*-acting factors (25). Therefore, this raises the question of whether the recruitment of the localization and translational repression machineries on a given mRNA occurs independently, or if their assembly depends on each other. Evidence for co-dependency between these factors comes from yeast, in which previous studies have shown that the nuclear targeting of the mRNA localization factor She2 is important for the binding of the translational repressor Puf6 on *ASH1* mRNA (13). In the absence of She2 in the nucleus, *ASH1* mRNA localization defects and premature *ASH1* mRNA translation have been observed (12,13).

In this study, we describe a novel mechanism allowing the functional coupling between mRNA localization and translational control factors on localized mRNAs. We show that the translational repressor Puf6 is recruited co-transcriptionally on its target mRNAs via an interaction with the mRNA localization factor She2, mediated by the protein Loc1 (Figure 7). We provide evidence of a ternary complex formed between She2, Loc1 and Puf6, which explains how recruitment of Puf6 on the 3'UTR of *ASH1* mRNA is dependent on Loc1 and She2. The dependency of Puf6 recruitment on Loc1 emphasizes a direct role for Loc1 in coupling mRNA localization and translational control. Current genetic evidence supports this model, since the deletion of *LOC1* phenocopy a *puf6* KO, as both mutants disrupt *ASH1* mRNA localization (8,10), and increase *ASH1* mRNA translation (11,12). It was previously

suggested that Loc1 acts on *ASH1* mRNA translation by mediating the synthesis of “specialized ribosomes” (11). Although we cannot exclude this possibility, our results point toward a primary function for this protein as a loading factor for Puf6. This novel function of Loc1 is crucial for a complete assembly of RNA localization factors on *ASH1* mRNA, as we showed that Puf6 interaction with its RNA motif is limited *in vivo* in the absence of both She2 and Loc1.

Our results are in agreement with a recent study published while this manuscript was in revision, which also report a direct interaction between She2 and Loc1 *in vitro* (26). However, no direct interaction between recombinant Puf6 and Loc1 was detected in this study, and the authors did not observe the formation of a Puf6:Loc1:She2 ternary complex on the E3 RNA zipcode *in vitro*. While these results await *in vivo* validation, experimental conditions and differences in protein tagging may explain the divergences between our studies. Our finding of a co-transcriptional recruitment of Puf6 by Loc1 also challenges a previous model suggesting that Puf6 and Loc1 are loaded post-transcriptionally on *ASH1* mRNA in the nucleolus prior to its export to the cytoplasm (12). Evidence for this nucleolar transition comes from an experiment showing that upon blocking nuclear export, *ASH1* mRNA accumulates in the nucleolus in a She2-dependent manner (12). However, our study does not eliminate the possibility that *ASH1* must pass through the nucleolus before being exported to the cytoplasm.

Using ChIP-chip, we show that Puf6 is loaded co-transcriptionally on other target mRNAs and, at least in the case of bud-localized mRNAs, this loading is dependent on both She2 and Loc1. Unlike ChIP-qPCR results, binding pattern of ChIP-chip data shows an enrichment signal which spreads over a region on identified genes, a profile which may suggest an interaction of Puf6 with the transcriptional machinery. However,

immunoprecipitation of Spt4 and Spt5 results in an RNase sensitive co-purification of Puf6 (Supplementary Figure S6), excluding the possibility of a direct interaction between Puf6 and elongating RNA Polymerase. Thus, we assume that the observed discrepancy in enrichment pattern of Puf6 on *ASH1* by ChIP-qPCR and newly identified targets by ChIP-chip is likely due to differences in the ChIP protocols used.

Analysis of the ChIP-chip results reveals that Puf6 binds preferentially to mRNA encoding factors involved in cell wall biogenesis. For instance, Puf6 binds to the transcripts coding for 4 of the 5 cell wall stress sensors: *WSC2* and 3, *MTL1* and *MID2* (27), suggesting that Puf6 may coordinate the regulation of these proteins. Interestingly, Puf6 targets largely overlap with the known mRNA targets of Khd1, including a preferential association with mRNAs encoding for cell wall proteins (28,29). These results reveal a very close functional relationship between these two translational repressors, as previously suggested by their common role in regulating *ASH1* mRNA translation.

Finally, the coordinated mechanism of Puf6 recruitment is reminiscent of ZBP1 loading on β -actin mRNA, which localizes this transcript at the leading edge of fibroblasts (30). ZBP1 is recruited co-transcriptionally on nascent β -actin mRNA and its loading requires prior recruitment of the predominately nuclear protein ZBP2 on a site near ZBP1-binding element or zipcode (31,32). Like ZBP2, Loc1 dissociates from the localization complex and is not exported to cytoplasm. While no direct interaction has been reported between ZBP1 and ZBP2, this reveals that such coordinated assembly is also used on localized mRNA in metazoans. In a more general perspective, recent evidence suggests that the cytoplasmic fate of an mRNA (its cytoplasmic localization and decay) can be primed on nascent transcripts (5,33). Our results further broaden this perspective by showing that translational regulation is

also established on nascent mRNAs, and that mRNA transcription is a process during which mechanisms of post-transcriptional gene regulation can be coordinated.

FUNDING

This project was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CHIR) MOP-43855 and MOP-130325 (to PC), and MOP-82891 (to FR). CJ held a L'Oréal Canada-UNESCO for Women in Science Research Excellence fellowship.

Supplementary Data are available at NAR Online

REFERENCES

1. Martin, K.C. and Ephrussi, A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, **136**, 719-730.
2. Shahbadian, K. and Chartrand, P. (2012) Control of cytoplasmic mRNA localization. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 535-552.
3. Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L. and Vale, R.D. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11429-11434.

4. Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. and Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science*, **277**, 383-387.
5. Shen, Z., St-Denis, A. and Chartrand, P. (2010) Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev*, **24**, 1914-1926.
6. Muller, M., Heym, R.G., Mayer, A., Kramer, K., Schmid, M., Cramer, P., Urlaub, H., Jansen, R.P. and Niessing, D. (2011) A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS Biol*, **9**, e1000611.
7. Takizawa, P.A. and Vale, R.D. (2000) The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5273-5278.
8. Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. and Singer, R.H. (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*, **18**, 1452-1465.
9. Deng, Y., Singer, R.H. and Gu, W. (2008) Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev*, **22**, 1037-1050.
10. Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H. and Chartrand, P. (2001) An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol*, **153**, 307-318.

11. Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P. and Silver, P.A. (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, **131**, 557-571.
12. Du, T.G., Jellbauer, S., Muller, M., Schmid, M., Niessing, D. and Jansen, R.P. (2008) Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO Rep*, **9**, 781-787.
13. Shen, Z., Paquin, N., Forget, A. and Chartrand, P. (2009) Nuclear shuttling of She2p couples ASH1 mRNA localization to its translational repression by recruiting Loc1p and Puf6p. *Mol Biol Cell*, **20**, 2265-2275.
14. Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, K.C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Yates, J.R., 3rd and Hartzog, G.A. (2003) Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol*, **23**, 1368-1378.
15. Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
16. Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.E., Laramee, L., Fortin, M.E., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D. and Robert, F. (2012) A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Mol Cell*, **45**, 158-170.

17. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G. *et al.* (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, **122**, 947-956.
18. Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F. and Chartrand, P. (2005) Identification of a conserved RNA motif essential for She2p recognition and mRNA localization to the yeast bud. *Mol Cell Biol*, **25**, 4752-4766.
19. Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R.H. and Burley, S.K. (2004) She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell*, **119**, 491-502.
20. Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
21. Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M. and Nasmyth, K. (1996) Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell*, **84**, 687-697.
22. Gerber, A.P., Herschlag, D. and Brown, P.O. (2004) Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol*, **2**, E79.
23. Besse, F. and Ephrussi, A. (2008) Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 971-980.

24. Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J. and Singer, R.H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, **438**, 512-515.
25. Vazquez-Pianzola, P. and Suter, B. (2012) Conservation of the RNA Transport Machineries and Their Coupling to Translation Control across Eukaryotes. *Comp Funct Genomics*, **2012**, 287852.
26. Niedner, A., Müller, M., Moorthy, B.T., Jansen, R.-P. and Niessing, D. (2013) Role of Loc1p in assembly and reorganization of nuclear ASH1 messenger ribonucleoprotein particles in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, E5049-E5058.
27. Levin, D.E. (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, **189**, 1145-1175.
28. Hasegawa, Y., Irie, K. and Gerber, A.P. (2008) Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *RNA*, **14**, 2333-2347.
29. Wolf, J.J., Dowell, R.D., Mahony, S., Rabani, M., Gifford, D.K. and Fink, G.R. (2010) Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics*, **185**, 513-522.
30. Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. and Singer, R.H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 2158-2165.

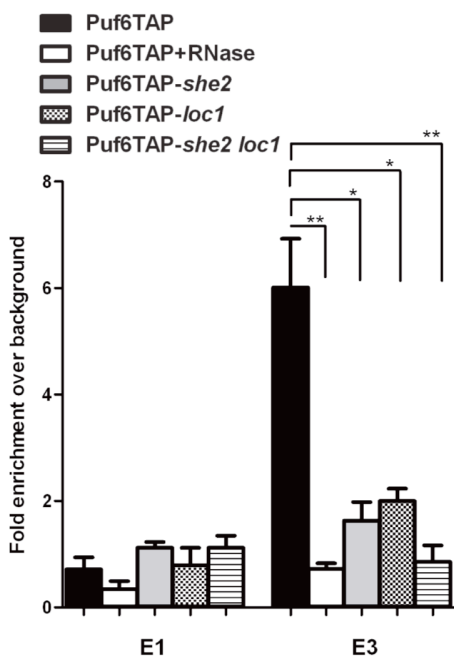
31. Oleynikov, Y. and Singer, R.H. (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol*, **13**, 199-207.
32. Pan, F., Huttelmaier, S., Singer, R.H. and Gu, W. (2007) ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol*, **27**, 8340-8351.
33. Haimovich, G., Choder, M., Singer, R.H. and Trcek, T. (2013) The fate of the messenger is pre-determined: a new model for regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta*, **1829**, 643-653.
34. Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
35. Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H. and Chartrand, P. (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J*, **19**, 6592-6601.

FIGURES LEGENDS

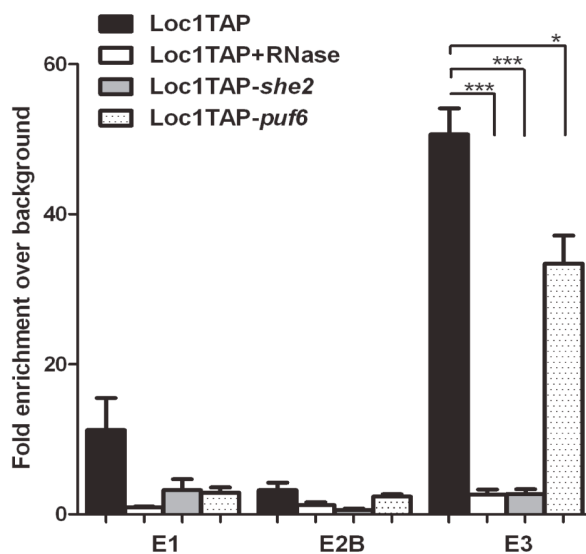
A



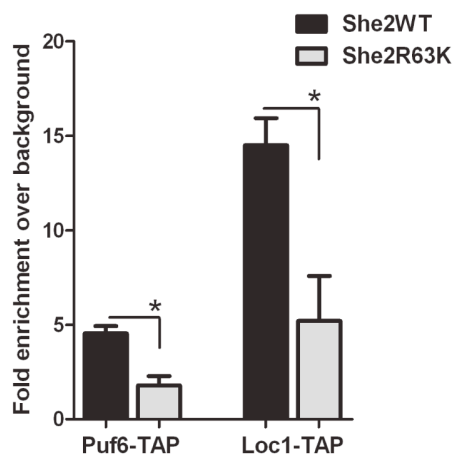
B



C



D



E

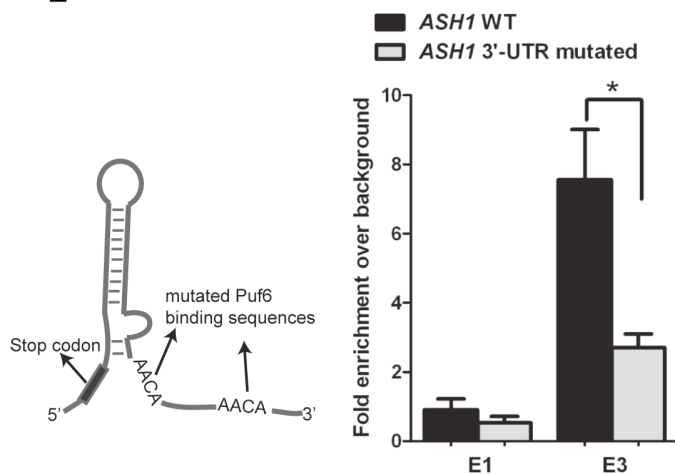


Figure 1: Puf6 and Loc1 are recruited co-transcriptionally on *ASH1* mRNA.

(A) Schematic presentation of the *ASH1* gene. Dark boxes represent localization elements. Arrows represent amplicons used for qPCR analysis. Amplicon lengths for E1, E2 and E3 are 101bp, 128bp and 101bp, respectively. **(B)** ChIP of Puf6-TAP in WT and mutant strains. After immunoprecipitation of Puf6-TAP, amplicons corresponding to E1 and E3 were amplified. For RNase treatment, chromatin was treated with RNase A prior immunoprecipitation. **(C)** ChIP of Loc1-TAP in WT and mutant strains. After chromatin immunoprecipitation three amplicons E1, E2B and E3 were analyzed by qPCR. **(D)** ChIP of Puf6-TAP and Loc1-TAP in strains expressing WT or an RNA-binding mutant of She2 from a centromeric plasmid. After ChIP recruitment of Puf6-TAP and Loc1-TAP on E3 localization element were analyzed by qPCR. **(E)** ChIP of Puf6-TAP in a strain with mutated Puf6 binding sequence in the 3'UTR of *ASH1* mRNA. At left is a schematic presentation of the E3 localization element with two UUGU sequences mutated to AACAA. After performing ChIP in wild-type and mutated *ASH1*, E1 and E3 amplicons were analyzed by qPCR. Values presented are mean \pm SEM (N=3) (* p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, unpaired *t*-test).

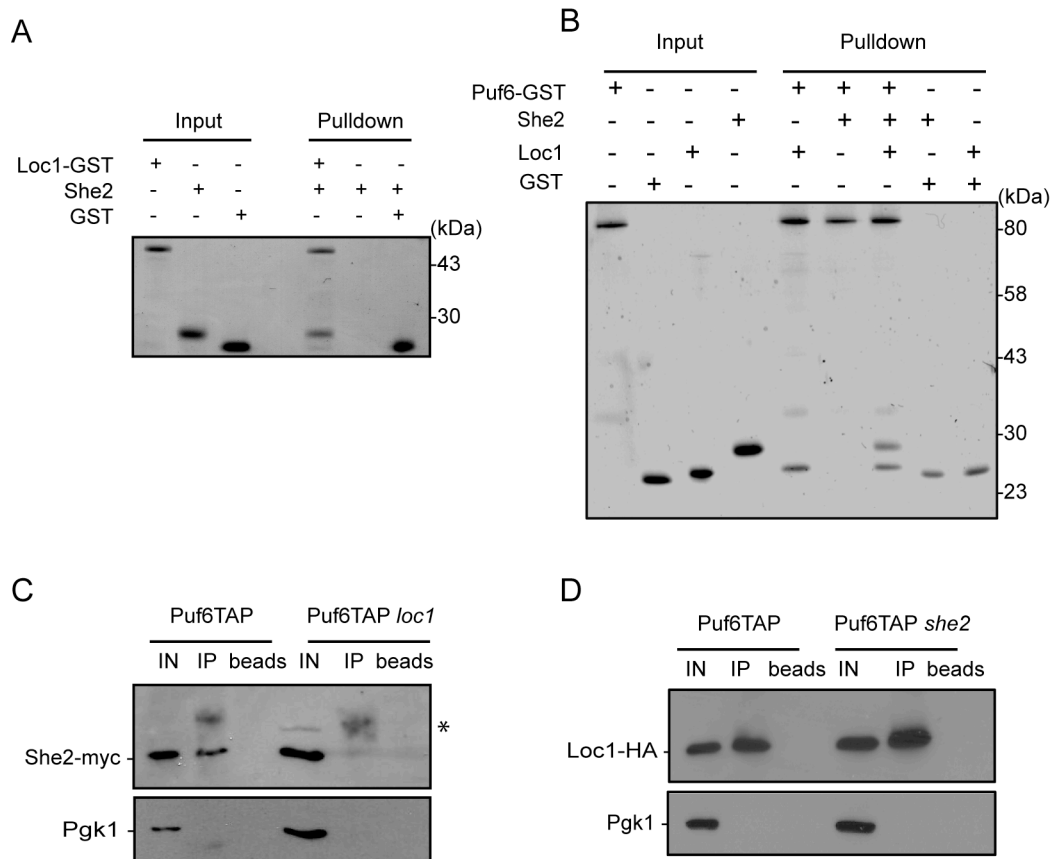


Figure 2: Puf6, Loc1 and She2 interact together and form a ternary complex *in vitro* and *in vivo*.

(A) GST pull-down experiment to assess direct interaction between Loc1 and She2. Recombinant Loc1-GST and She2 were incubated together and the complex retained on glutathione beads was eluted and analyzed on PAGE by Coomassie blue staining. (B) GST pull-down experiment to detect interactions between recombinant Puf6-GST, Loc1 and She2. Puf6-GST is interacting directly with Loc1 but not She2. To detect ternary complex formation, Puf6-GST was incubated with both Loc1 and She2. (C) Co-immunoprecipitation assay to detect interaction of Puf6 and She2. Puf6-TAP was immunoprecipitated using total rabbit IgG

and the co-purification of She2-myc was verified by performing western blot using rabbit *polyclonal* antibody to *myc* epitope. In a *loc1* strain, the interaction between She2-myc and Puf6-TAP is abolished. The asterisk corresponds to IgG heavy chain. **(D)** Co-immunoprecipitation assay to detect interaction of Loc1 and Puf6. Immunoprecipitation of Puf6-TAP using total rabbit IgG, leads to the co-purification of Loc1-HA in both wild type and *she2* strains. Western blot was performed using mouse monoclonal HA.11 antibody. All experiments presented were repeated reproducibly three times.

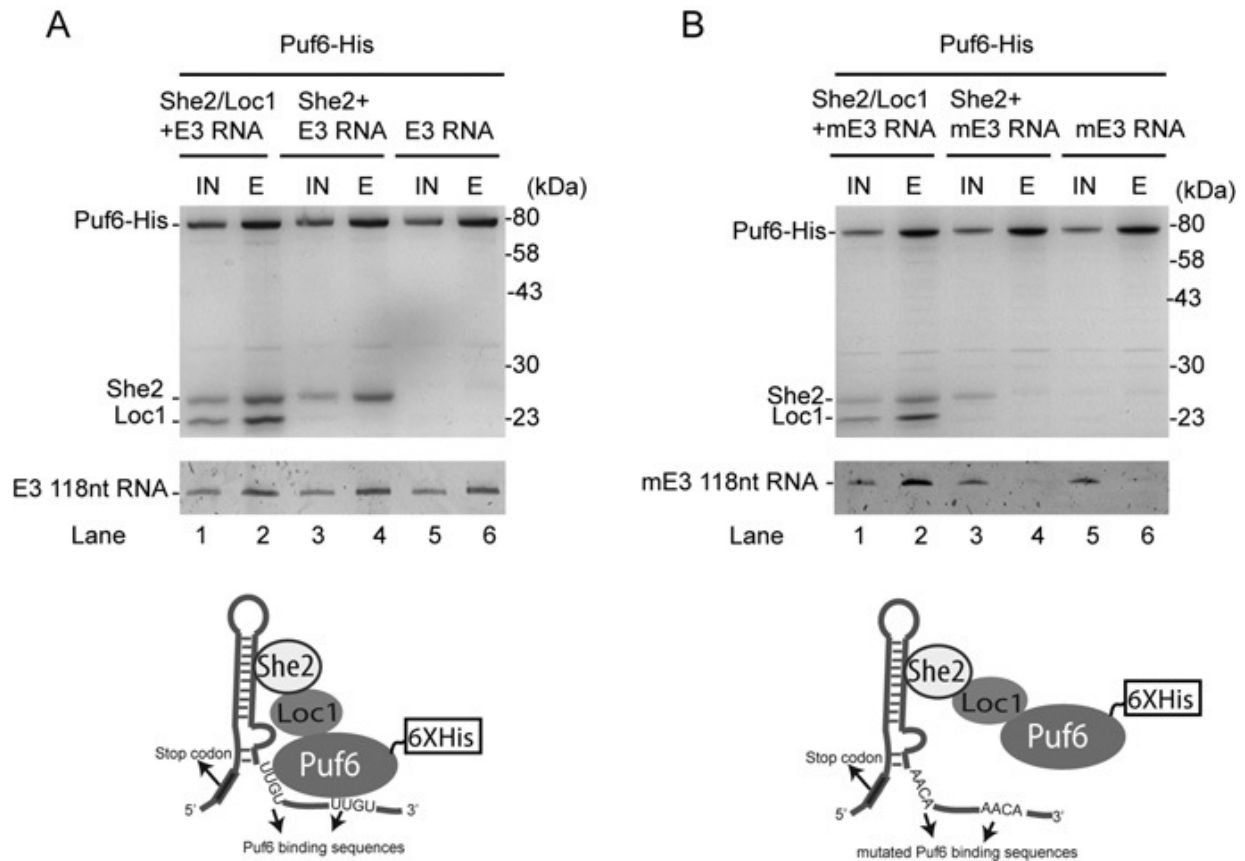
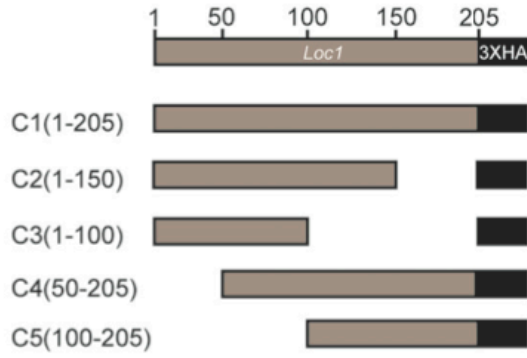


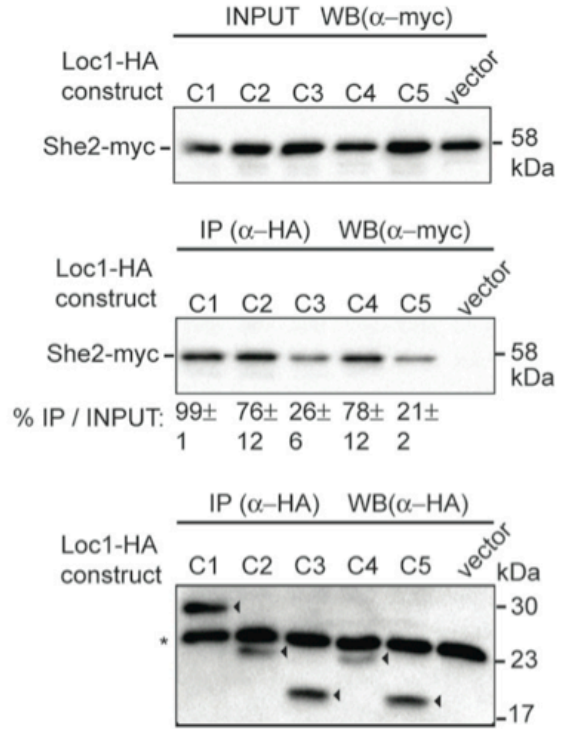
Figure 3: *in vitro* reconstitution assay of E3-mRNP.

(A) Pull-down experiment with Puf6-His, Loc1, She2 and 118 nt E3 RNA. Upper gel corresponds to protein gel stained by Coomassie blue, lower gel is RNA PAGE stained by Gel-RED (IN=Input, E=Elution). At bottom, cartoon represents schematic interaction between proteins used in the pull-down experiment and E3-118nt RNA. (B) *In vitro* reconstitution assay using E3 RNA with mutated Puf6 binding sequences (mE3). Pull down experiments performed using Puf6-His, Loc1, She2 and mE3-118nt. Note that RNA is co-purified with Puf6-His only when ternary protein complex is present. Upper gel is protein gel, lower gel is RNA PAGE. At bottom, is schematic presentation of mutated RNA and protein complex.

A



B



C

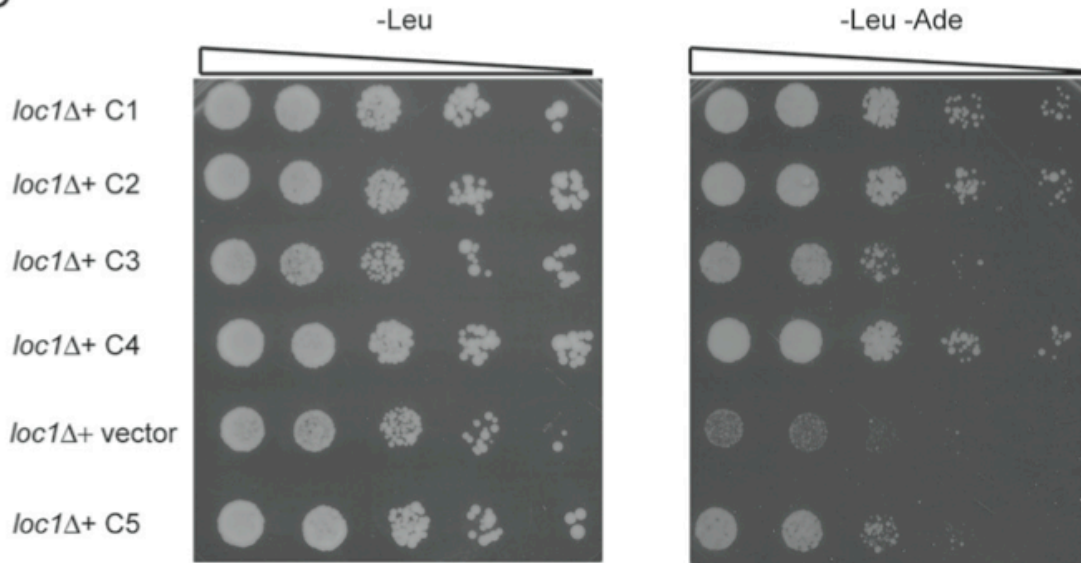


Figure 4: Interaction between She2 and Loc1 is important for efficient localization of *ASH1* mRNA.

(A). Diagram of Loc1-HA constructs (C1 to C5) cloned into the YCplac111 centromeric plasmid. (B) Co-immunoprecipitation assay to define the interacting domain of Loc1 with She2. Using monoclonal HA.11 antibody, Loc1-HA (C1 to C5) were immunoprecipitated and the presence of She2-myc was examined by western blotting using rabbit polyclonal anti-myc antibody. Upper panel shows input for each immunoprecipitation reaction. Middle panel shows western blot of co-immunoprecipitated She2-myc along with Loc1-HA (C1 to C5). Numbers at the bottom are quantification of the percentage of IP over Input. Values presented are mean \pm SEM (N=3). Bottom panel correspond to the same membrane stripped and hybridized with monoclonal HA.11 antibody to show the efficiency of Loc1-HA immunoprecipitation. Arrowheads indicate different Loc1-HA constructs. Asterisk indicates light chain of IgG. (C) Yeast genetic assay to assess *ASH1* mRNA localization in Loc1 deletion mutants. K4452 *loc1* strain was transformed by empty vector YCPlac111 or different Loc1-HA constructs (C1 to C5). Dilutions of exponentially growing yeasts were spotted on (-Leu) and (-Leu - Ade) plates and incubated at 30°C.

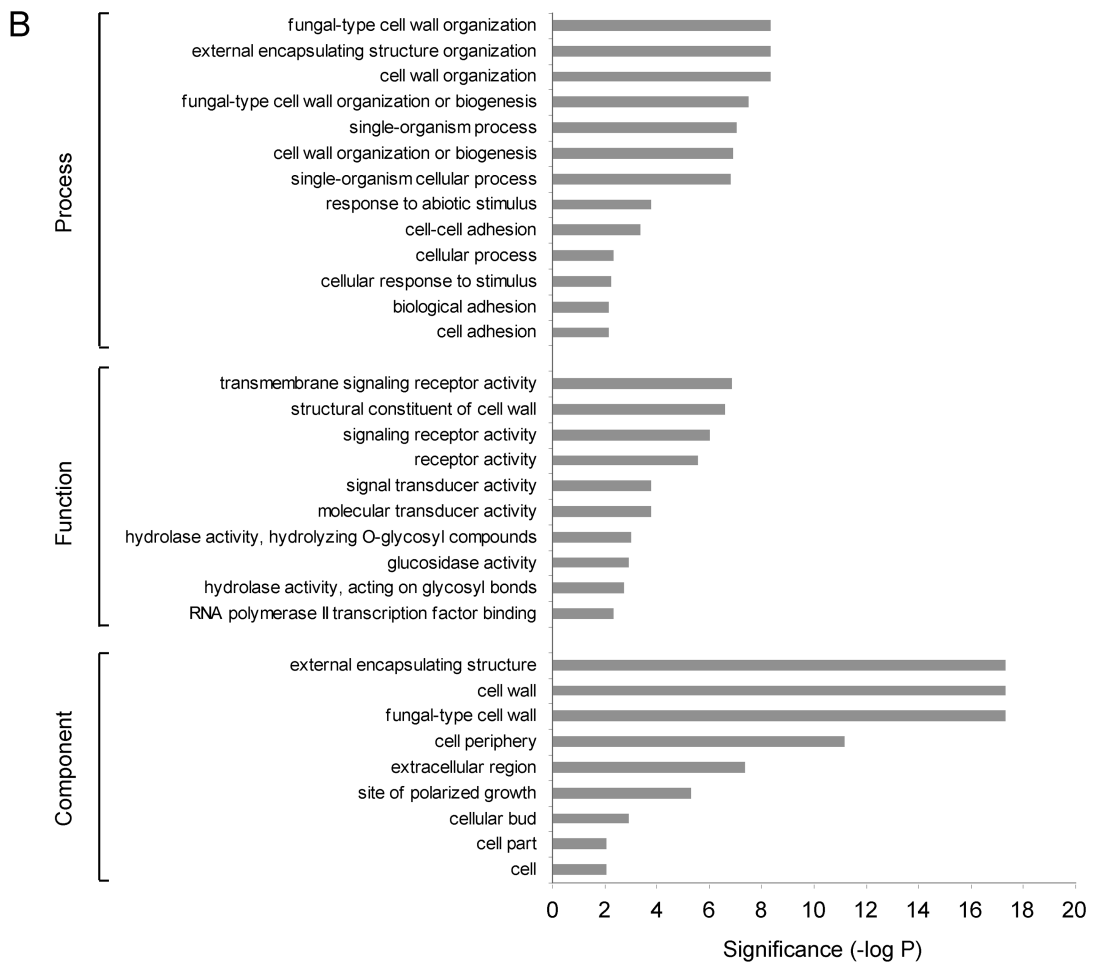
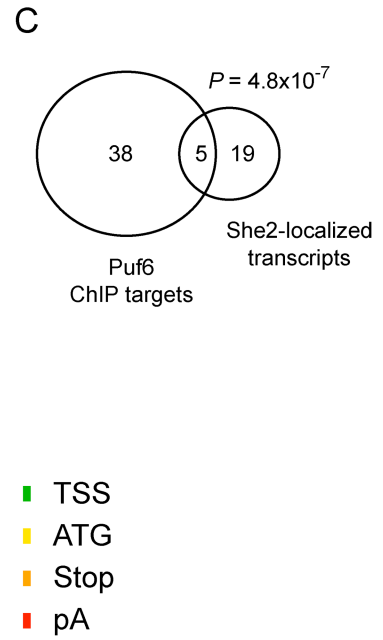
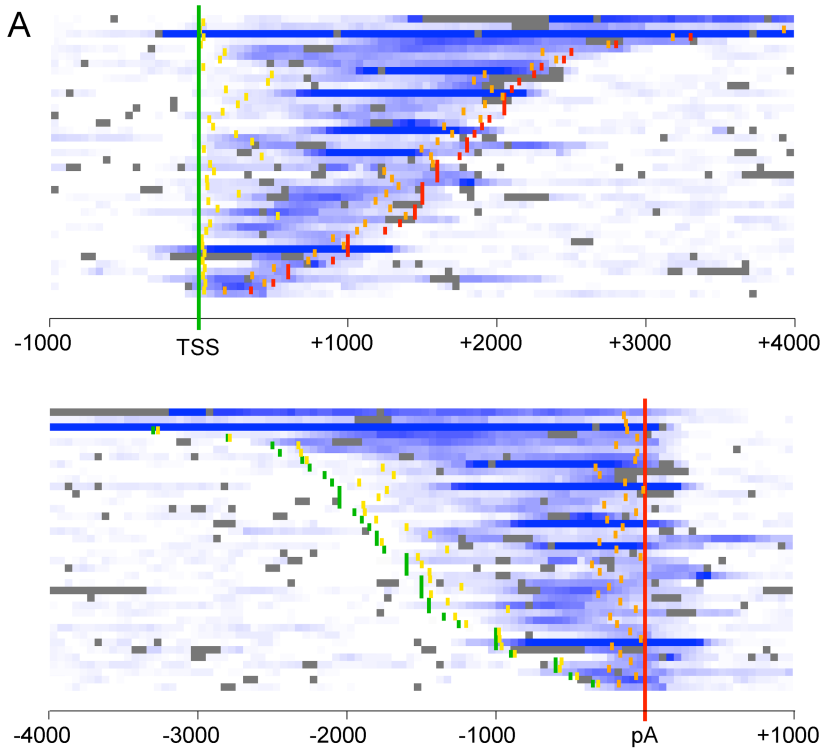


Figure 5: Genome-wide identification of Puf6 targets.

(A) Heat map of Puf6 occupancy (shades of blue) along its target genes. Genes were either aligned on their transcription start sites (TSS; top panel) or on their polyadenylation signal site (pA; bottom panel). The positions for the TSS (green), ATG (yellow), stop codon (orange) and pA (red) are shown. **(B)** A Venn diagram showing the overlap between the 43 Puf6 target genes identified in this study and the 24 She2-localized transcripts identified by (3). **(C)** Gene Ontology (GO) categories that are significantly enriched among the 43 Puf6 target genes identified in this study. Categories with an enrichment (p value) of 0.01 or less are shown.

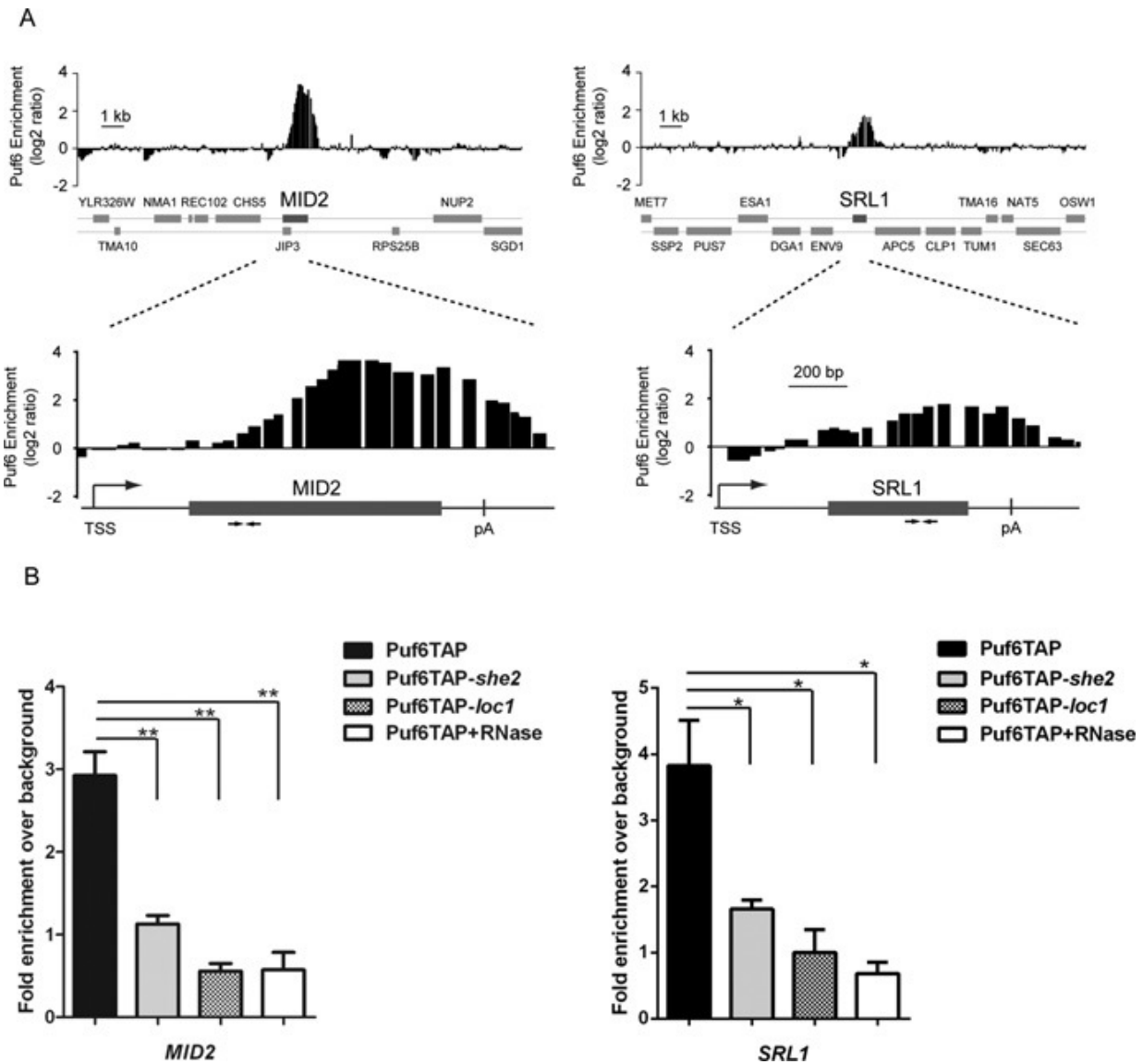


Figure 6: She2- and Loc1-dependent co-transcriptional recruitment of Puf6 on bud localized mRNAs.

(A) Genome browser snapshots of Puf6 enrichment over the regions surrounding the *MID2* and *SRL1* genes. The bottom part shows zoom in views and arrows represent amplicons used for qPCR analysis. Amplicon lengths for *MID2* and *SRL1* are 92bp and 90bp, respectively.

(B) ChIP-qPCR confirmation of Puf6-TAP recruitment on *MID2* and *SRL1*, in WT, *she2* and *loc1* strains. Values presented are mean \pm SEM (N=3) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, unpaired *t*-test).

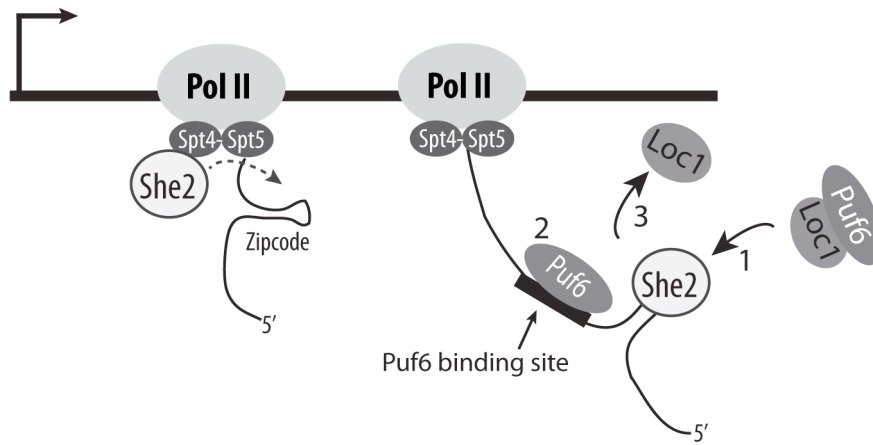


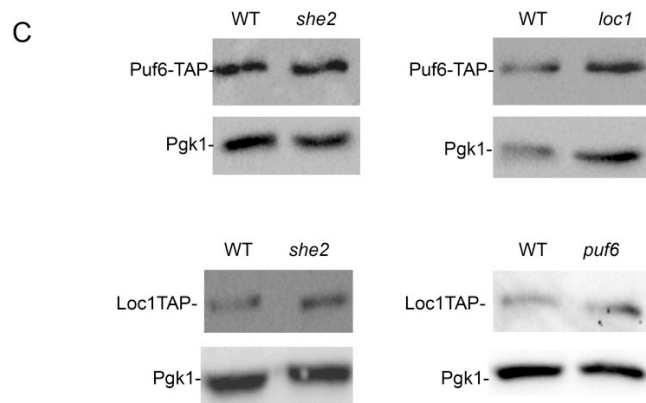
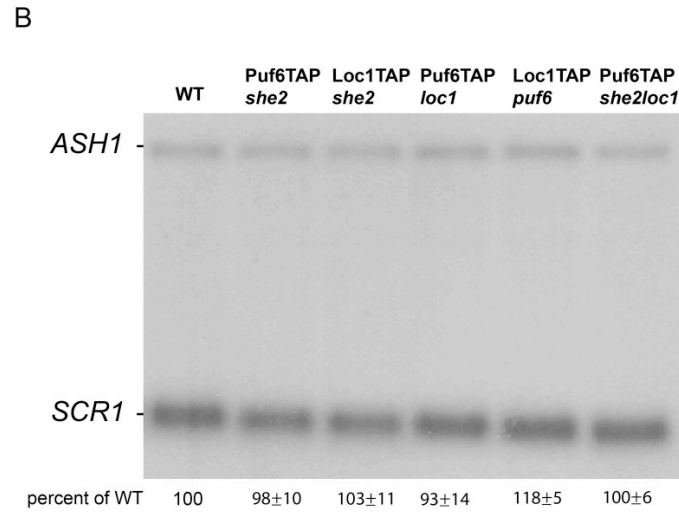
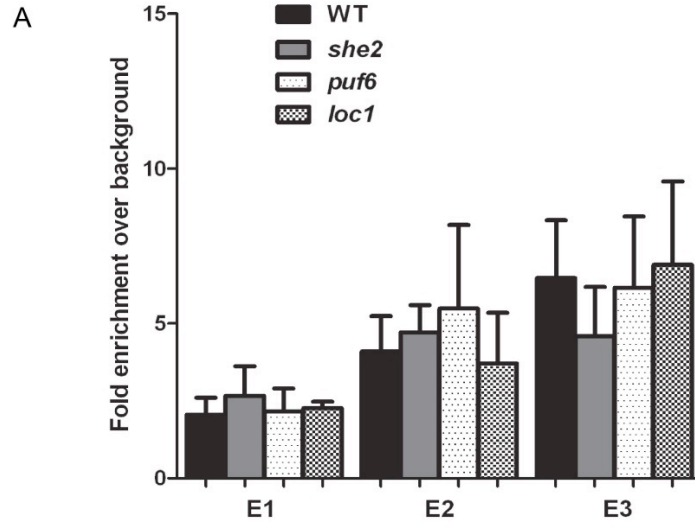
Figure 7: Model for the recruitment of Puf6 on bud localized mRNAs.

After being co-transcriptionally loaded on the elongating mRNA via She2 and Loc1 (1), Puf6 is transferred to the nascent mRNA via an interaction with its binding site (2). Since Loc1 never leaves the nucleus (10), it should be separated from the complex (3) before the mRNP complex is exported to the cytoplasm.

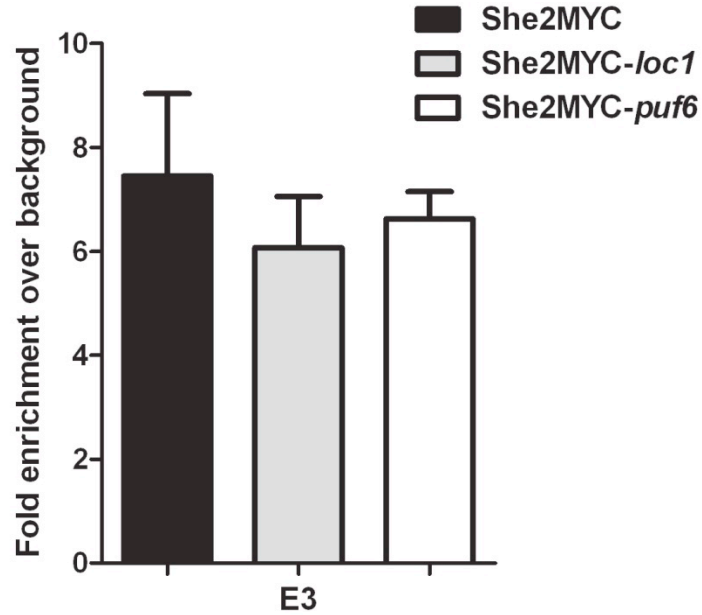
Supplementary information for:

Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization

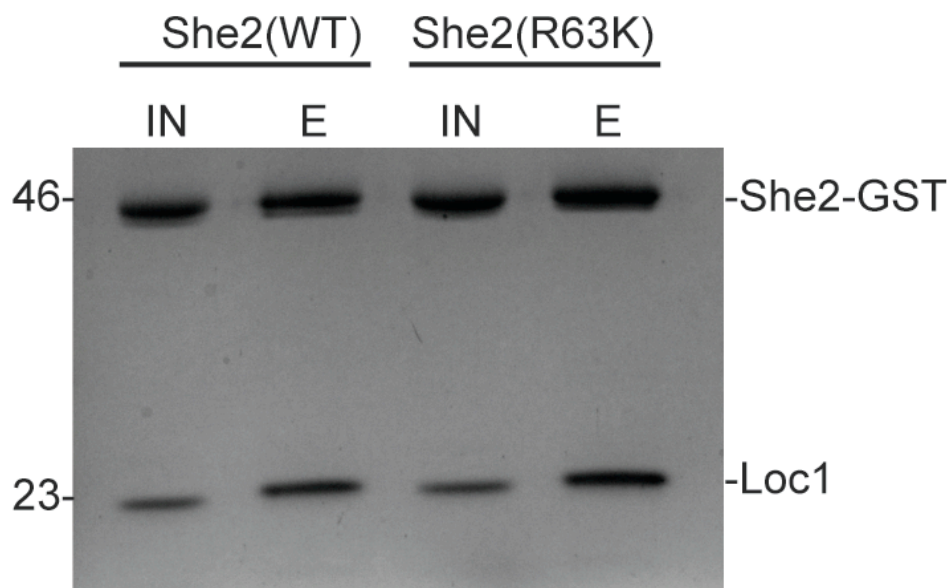
Karen Shahbadian, Célia Jeronimo, Amélie Forget, François Robert, Pascal Chartrand



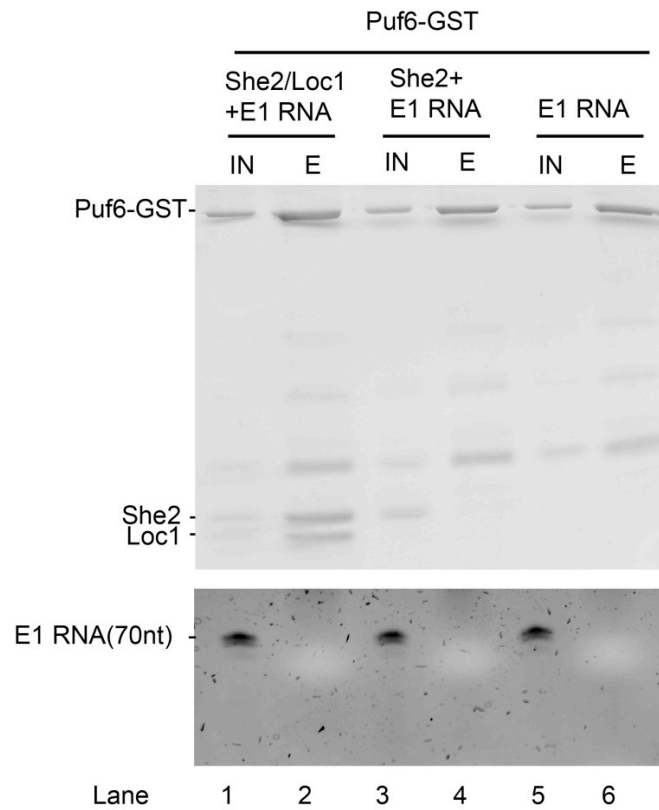
Supplementary Figure S1: Effect of *she2*, *loc1* or *puf6* mutants on *ASH1* transcription, *ASH1* mRNA levels and TAP-tagged protein expression levels. A)ChIP performed with monoclonal 8WG16 antibody. After ChIP, enrichment of E1, E2B and E3 amplicons were quantified by q-PCR. *SCR1* which is transcribed by RNA Pol III was used as background. Data presented are mean \pm SEM (N=3) B) Northern blot performed on RNAs extracted from wild-type and mutant strains. *ASH1* mRNA level was quantified and normalized to *SCR1* mRNA. Numbers at the bottom of the gel is percentage of *ASH1* mRNA comparing to wild-type strain(C) Western blot analysis of Puf6-TAP and Loc1-TAP in wild-type and mutant strains. Upper panels are western blot detection of Puf6-TAP in WT, *she2* and *loc1* strains. Lower panels are western blot of Loc1-TAP in WT, *she2* and *puf6* strains.



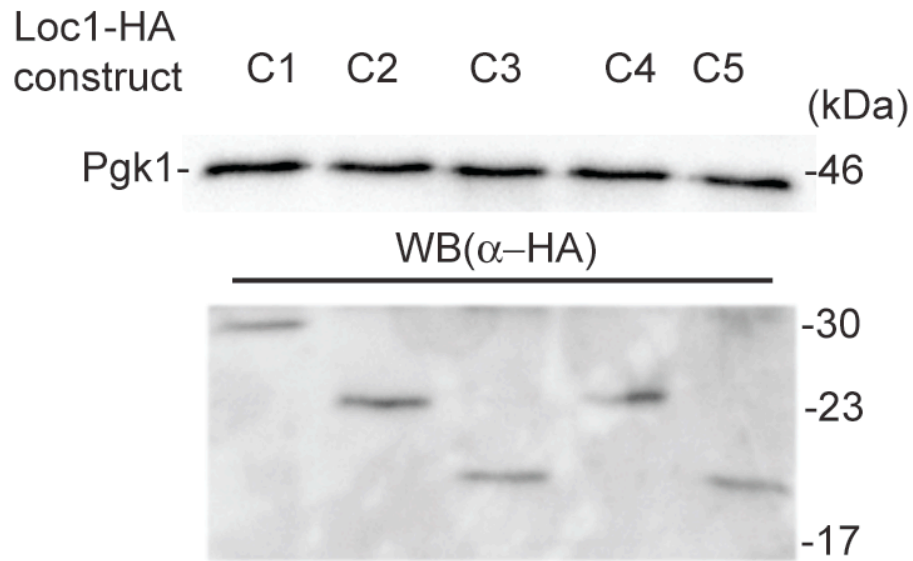
Supplementary Figure S2: The recruitment of She2 is independent of Loc1 and Puf6: ChIP of She2-myc was performed using monoclonal 9E10 antibody, and enrichment of She2-myc on E3 element, in wild type and mutant strains was quantified using q-PCR. Data presented are mean \pm SEM (N=3).



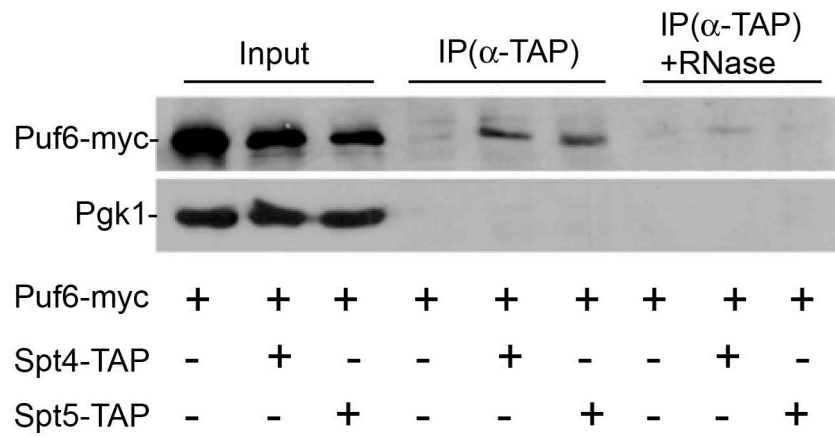
Supplementary Figure S3: She2WT and She2R63K mutant interact with same efficiency with Loc1. GST pull down experiment performed by purified She2-GST (WT and R63K mutant) and Loc1 recombinant protein. Note that same amount of Loc1 protein is eluted from WT or mutant She2-GST.



Supplementary Figure S4: *in vitro* reconstitution assay of E1-mRNP. Pull down experiment with Puf6-GST, Loc1, She2 and 70 nt E1 RNA. Note that RNA was not eluted from neither of complexes showing that there is no interaction between E1 RNA and Puf6-GST or She2. Upper gel corresponds to protein gel stained by Coomassie blue, lower gel is RNA PAGE stained by Gel-RED (IN=Input, E=Elution).



Supplementary Figure S5: Expression level of Loc1-HA constructs (C1 to C5) in BY4741 *loc1 She2-myc* strain. Upper panel is western blot detection of Pgk1 using anti-Pgk1 antibody. Lower panel correspond to western blot of Loc1-HA using anti-HA antibody.



Supplementary Figure S6: Puf6 interacts with Spt4-Spt5 via RNA. Co-immunoprecipitation assay to explore the interaction of Puf6-myc with Spt4-TAP and Spt5-TAP. Note that after RNase treatment the interaction is abolished.

Supplementary Table S1. Strains used in this study

Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Open Biosystems
BY4741 <i>she2</i>	BY4741 <i>she2::KAN</i>	Open Biosystems
Puf6-TAP	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3</i>	Open Biosystems
Loc1-TAP	BY4741 <i>LOC1-TAP::HIS3</i>	Open Biosystems
Puf6-TAP <i>she2</i>	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN</i>	This study
Puf6-TAP <i>loc1</i>	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 loc1::URA3</i>	This study
Puf6-TAP <i>she2 loc1</i>	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN loc1::URA3</i>	This study
Loc1-TAP <i>she2</i>	BY4741 <i>LOC1-TAP::HIS3 she2::KAN</i>	This study
Loc1-TAP <i>puf6</i>	BY4741 <i>LOC1-TAP::HIS3 puf6::KAN</i>	This study
Puf6-TAP She2MYC	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN</i> + YCP111She2MYC	This study
Puf6-TAP She2R63KMYC	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN</i> + YCP111She2R63KMYC	This study
Puf6-TAP <i>loc1</i> She2MYC	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN loc1::URA3</i> + YCP111She2MYC	This study
Puf6-TAP Loc1-HA	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 LOC1-HA::Leu2</i>	This study
Puf6-TAP <i>she2</i> Loc1-HA	BY4741 <i>PUF6-TAP::HIS3 she2::KAN LOC1-HA::Leu2</i>	This study
Loc1-TAP She2MYC	BY4741 <i>LOC1-TAP::HIS3</i> + YCP111She2MYC	This study
Loc1-TAP She2R63KMYC	BY4741 <i>LOC1-TAP::HIS3</i> + YCP111She2R63KMYC	This study
She2-MYC	BY4741 <i>SHE2-13xMYC::HIS3</i>	This study
She2-MYC <i>loc1</i>	BY4741 <i>SHE2-13xMYC::HIS3 loc1::KAN</i>	This study
She2-MYC <i>puf6</i>	BY4741 <i>SHE2-13xMYC::HIS3 puf6::KAN</i>	This study
BY4741 <i>ash1</i>	BY4741 <i>ash1::KAN</i>	This study
BY4741 <i>ASH1</i> WT	BY4741 <i>ash1::KAN</i> + YIP128- <i>ASH1</i> WT	This study
BY4741 <i>ASH1</i> 3'UTR mutated	BY4741 <i>ash1::KAN</i> + YIP128- <i>ASH1</i> 3'UTRmutated	This study

Supplementary Table S2. Plasmids used in this study

pGEX-6P1	Vector for the expression of GST fused proteins with PreScission cleavage site	GE healthcare
pGEX-4T3	Vector for the expression of GST fused proteins with Thrombin cleavage site	GE healthcare
YCPlac111	Single copy yeast vector with <i>LEU2</i> selectable marker	(Gietz and Sugino, 1988)
YIP128	Yeast integrative vector with <i>LEU2</i> selectable marker	(Gietz and Sugino, 1988)
pGEX-6P1-SHE2	Vector for expression of SHE2-GST	(Shen et al., 2010)
pGEX-6P1-LOC1	Vector for expression of LOC1-GST	This study
pGEX-4T3-PUF6-His	Vector for expression of PUF6 with N-terminal GST tag and C-terminal His-tag	This study
pGEM4Z1-E1	For <i>in vitro</i> transcription of E1 element	(Olivier et al., 2005)
pRL168	For <i>in vitro</i> transcription of E3 element	(Long et al., 2000)
pGEM4Z1-mE3	For <i>in vitro</i> transcription of mutated E3 element	This study
YCP111-SHE2MYC	Expresses SHE2-MYC from endogenous promoter	This study
YCP111-SHE2R63KMYC	Expresses SHE2R63K-MYC from endogenous promoter	This study
YIP128- <i>ASH1</i> WT	Integrative plasmid used for the integration of WT <i>ASH1</i> in <i>LEU2</i> locus	This study
YIP128- <i>ASH1</i> 3'UTRmutated	Integrative plasmid used for the integration of 3'UTR mutated <i>ASH1</i> in <i>LEU2</i> locus	This study

Supplementary Table S3. Primers used for ChIP

Primer	Sequence
E1-for	TGGAAACTGATCTTACCCATTG
E1-Rev	TTGGGTATACTTAATGGCTTGAAA
E2B-for	CGACAACGCTAGTTACAG
E2B-Rev	TTGGGCTTGGAGTGTATG
E3-for	TCGTAAGATCCCCACAAAGG
E3-Rev	AACGGTACCCTTCAATTTTCG
Intergenic-for	TAGGGCACGTACATGGCAAC
Intergenic-rev	CATCGTCATCACGCTTCATC
SCR1-for	TCTGGTGGGATGGGATAC
SCR1-rev	CGGTGCGGAATAGAGAAC
MID2-for	GAGTTCGTCTACCAGCATTG
MID2-rev	CTGAAGAAGCAGAGGAAGAG
SRL1-for	CTGCAGCAAGTGTCAGTG
SRL1-rev	GGACGCAACCATTGGAAG

Supplementary References.

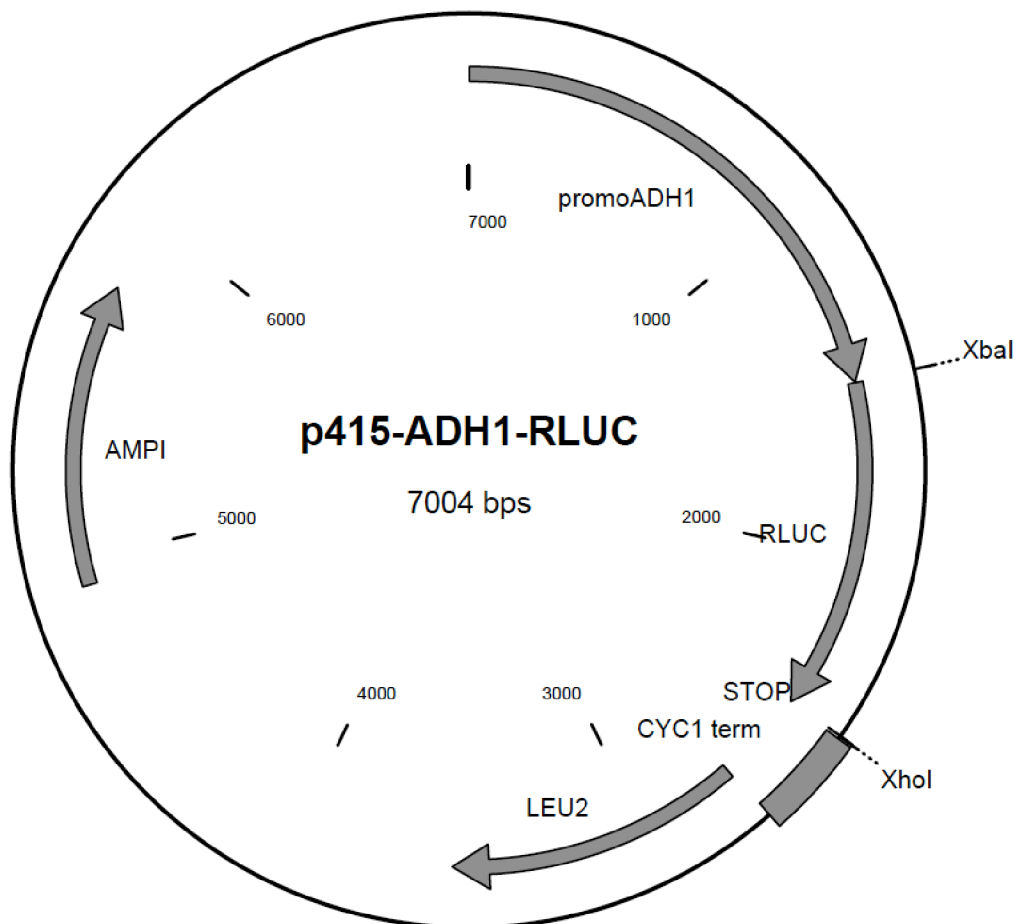
Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.

Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to *ASH1* mRNA. *EMBO J* 19, 6592-6601.

Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., and Chartrand, P. (2005). Identification of a conserved RNA motif essential for She2p recognition and mRNA localization to the yeast bud. *Mol Cell Biol* 25, 4752-4766.

Shen, Z., St-Denis, A., and Chartrand, P. (2010). Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev* 24, 1914-1926.

Annexe 3 : Plan de construction du plasmide p415-ADH1-RLUC



Le plasmide p415-ADH1-RLUC contient la séquence codante de la luciférase de la *Renilla* (RLUC) sous le contrôle du promoteur fort *ADH1* de la levure *S. cerevisiae* et peut être construit à partir du plasmide p415-KHD1-VF2 (Paquin et al., 2007). En effet, ce plasmide contient la séquence du promoteur *ADH1*. De plus, la séquence KHD1-VF2 peut être clivée avec les enzymes *XbaI* et *XhoI* pour être remplacée par la séquence *RLUC*. La séquence *RLUC* peut être amplifiée par PCR à partir du plasmide pRLU-globine avec les amorces RhLuc-*XbaI*-5' (cgcgcgtctagaatgacttcgaaagtttatgatccaga) et RhLuc-*XhoI*-3' (cgcgcgctcgagttattgtcattttgagaactcg) qui permettent d'ajouter les enzymes de restrictions *XbaI* et *XhoI* aux extrémités de la séquence codante *RLUC*.