

FRANÇOISE MORIN

CARACTÉRISATION *IN VIVO* DES FONCTIONS DES
FACTEURS DE TRANSCRIPTION RIBOSOMIQUE UBF
ET TTF-I

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître es Sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

Dans le but d'élucider les mécanismes de régulation de la transcription de l'ARN ribosomique et de la biosynthèse des ribosomes, deux facteurs de transcription ribosomique, soit UBF et TTF-I, furent étudiés dans le but de mieux caractériser leurs fonctions *in vivo*. Un modèle de désactivation conditionnelle du gène codant pour UBF chez la souris fut élaboré. Après l'inactivation d'un allèle chez des animaux hétérozygotes, aucun défaut développemental, physique ou comportemental n'a été observé lors d'investigations préliminaires. Un modèle de diminution inductible de TTF-I par le ciblage par shRNAmir fut développé. Des études de marquage métabolique au tritium ont permis de conclure qu'une diminution de TTF-I avait un effet appréciable sur la transcription ribosomique et un effet encore plus marqué sur la maturation des ARN ribosomiques. On voit une inhibition claire et nette de la maturation des ARN ribosomiques et aucune accumulation appréciable du précurseur ce qui indique aussi un problème de transcription. Des études du cycle cellulaire, effectués par « fluorescence-assisted cell sorting », ont permis de détecter un arrêt partiel en G1 qui se traduit en une diminution de la vitesse de passage de la phase G1 à G2/M lors d'une diminution de TTF-I. Finalement, un modèle de récupération fut développé en introduisant un vecteur conditionnel capable d'exprimer la forme pleine longueur de TTF-I dans les cellules de diminution conditionnelle. L'induction double et simultanée d'une forme pleine longueur de TTF-I et du shRNAmir ciblant TTF-I permit la récupération de la diminution de TTF-I chez ces cellules. Ce modèle de récupération permit de confirmer que les effets observés étaient dus à la diminution de TTF-I en excluant des effets secondaires.

Abstract

In order to clarify the mechanisms by which regulation of ribosomal synthesis is accomplished, we have targeted two ribosomal transcription factors, UBF and TTF-I, and have attempted to better characterize their *in vivo* functions. A conditional gene inactivation mouse model for UBF was generated. After inactivation of a single UBF coding allele in heterozygous animals, preliminary investigations revealed no significant developmental, physical or behavioural effects in the animals. An inducible knockdown model for TTF-I was developed in mouse cells using RNA interference technologies. Metabolic labelling with tritium showed that TTF-I knockdown had a significant effect on ribosomal RNA (rRNA) synthesis and even more obvious effects on rRNA processing. We observed clear inhibition of rRNA processing and no significant accumulation of the precursor indicating that there were also problems with transcription. Cell cycle analysis performed by fluorescence-assisted cell sorting (FACS) and showed partial arrest in G1 which translates into a slowing of passage from G1 phase to G2/M phase during TTF-I depletion. Finally, a rescue model was developed by introducing a conditional vector able to express full-length TTF-I into the conditional knockdown cells. Simultaneous induction of expression of the exogenous full length TTF-I and the shRNAmir targeting TTF-I rescued TTF-I knockdown in these cells. This rescue model, by excluding off-target effects, confirmed that our observations were due exclusively to the knockdown of TTF-I.

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire du Dr. Tom Moss au sein du Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval.

À l'occasion, je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche Dr. Tom Moss pour m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir fait preuve d'expertise scientifique robuste et de patience au cours du déroulement de mes études à la maîtrise.

J'aimerais également dire un gros merci à mes collègues de laboratoire : Steve Jean, Alexander Mykryukov, Joëlle Baril, Michel Tremblay, Frédéric Lessard, Frédéric Langlois et Victor Stefanovsky. J'aimerais spécialement exprimer ma gratitude à Michel Tremblay qui mis énormément de travail dans le développement de la lignée de souris KO conditionnel UBF et qui a toujours su me guider dans mes études. Un gros merci aussi à Victor Stefanovsky pour sa patience et son expertise quotidienne, ainsi que pour sa contribution considérable dans le cadre du projet TTF-I. Finalement, merci à Frédéric Lessard pour m'avoir formée comme il faut et pour l'aide constante, les bonnes discussions ainsi que son sens de l'observation pratique et sa bonne humeur persévérante.

À ma mère, à qui je dois tout.

Table des matières

Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Le ribosome	1
1.1.1 Importance pathologique de la synthèse protéique	1
1.1.2 La structure du ribosome	2
1.1.3 La régulation du ribosome	3
1.2 La biogenèse ribosomique	3
1.2.1 Le nucléole	3
1.2.2 Les gènes ribosomiques	6
1.2.3 La transcription ribosomique	10
1.2.3.1 L'initiation de la transcription ribosomique	11
1.2.3.2 L'élongation de la transcription ribosomique	12
1.2.3.3 La terminaison de la transcription ribosomique	14
1.2.4 La maturation des ARNr	15
1.3 La régulation de la biosynthèse ribosomique	17
1.4 UBF	20
1.4.1 Structure	20
1.4.2 Fonction	21
1.4.3 Régulation	22
1.5 TTF-I	24
1.5.1 Structure	24
1.5.2 Fonction	25
1.5.3 ARF	26
Chapitre 2 Méthodologie	30
2.1 UBF	30
2.1.1 Lignées cellulaires ES hétérozygotes UBF loxP ^{+/-}	33
2.1.2 Détermination des génotypes des lignées cellulaires hétérozygotes UBF loxP ^{+/-} par Southern	34
2.1.3 Obtention des souris hétérozygotes UBF loxP ^{+/-} et détermination des génotypes par analyse de type PCR	36
2.1.4 Obtention des souris hétérozygotes UBF ^{-/+} et détermination des génotypes par analyse PCR et de type Southern	37
2.2 TTF-I	38
2.2.1 Vecteur inducible TMP/shRNAmir-TTF-I	38
2.2.2 Génération des lignées cellulaires MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I (clone A10) et MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I + Flag TTF-I (clone A10 TTF-I)	40
2.2.3 Induction du shRNAmir ciblant TTF-I chez le clone A10 et le clone A10 TTF-I et analyse par Western blot	41
2.2.4 Marquages métaboliques des clones A10 et A10 TTF-I	43
2.2.5 Analyses FACS des clones A10, B10 et A10 TTF-I	44

Chapitre 3 Résultats	46
3.1 UBF	46
3.1.1 Vecteur de désactivation génique conditionnel pGKneo3'Del5'	46
3.1.2 Détermination des génotypes des lignées cellulaires ES hétérozygotes UBF loxP ^{+/-} par Southern	46
3.1.3 Détermination des génotypes des chimères, des hétérozygotes UBF loxP ^{+/-} et des hétérozygotes UBF ^{-/+} par analyse PCR ou Southern	47
3.2 TTF-I	48
3.2.1 Analyse Western blot et marquage métabolique du clone A10	48
3.2.2 Analyse Western blot et marquage métabolique du clone de récupération A10 TTF-I	50
3.2.3 Analyses FACS des clones A10, B10 et A10 TTF-I	53
Chapitre 4 Discussion et conclusion	55
4.1 UBF	55
4.2 TTF-I	56
Annexes	
Annexe A Vecteur pGKneoF2L2dta	59
Annexe B gUBFexons	60
Annexe C MSCV-TMP « Tetracycline-regulated retroviral vector-SIN-TREmiR30-PIG	64
Bibliographies	65

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Structure du nucléole	4
Figure 2 : Représentation schématique d'une répétition du gène ribosomique	9
Figure 3 : Structure de l'enhancesome et ses fonctions dans l'initiation et l'élongation de la transcription ribosomique	13
Figure 4 : Déroulement de la biogenèse ribosomique à travers les différents compartiments nucléolaires	16
Figure 5 : Maturation des ARNr	17
Figure 6 : Mécanismes potentiels de la régulation de la biogenèse ribosomique à travers les compartiments de la cellule	18
Figure 7 : Structure d'UBF	21
Figure 8 : Structure de TTF-I	24
Figure 9 : Co-immunoprécipitation démontrant l'interaction TTF-I/ARF (Frédéric Lessard, laboratoire Moss)	26
Figure 10 : Boucle de régulation p53/MDM2/ARF	27
Figure 11 : Effets de l'induction d'ARF (Frédéric Lessard, laboratoire Moss) et d'une diminution de B23 sur le processus de la maturation des ARNr	28
Figure 12 : Vecteur pGKneoF2L2dta(3'Del5'), recombinaison génomique et désactivation du gène	31
Figure 13 : Protéine produite avant et après la recombinaison des sites loxP par la CRE recombinase	33
Figure 14 : Exemple de clones cellulaires positifs dévoilés par analyse Southern blot du bout 3' de l'insertion	46
Figure 15 : Southern de l'extrémité 5' de l'insertion dans des clones cellulaires UBF loxP ^{+/-}	46
Figure 16 : Détermination des génotypes par Southern d'une portée de souris après croisement d'une femelle UBF loxP ^{+/-} avec un mâle Sox2CRE ^{+/-}	47
Figure 17 : Détermination des génotypes par analyse PCR d'une portée de souris après croisement d'une femelle UBF loxP ^{+/-} avec un mâle Sox2CRE ^{+/-}	47

Figure 18 : Analyse Western blot des clones A10 et B10 après des inductions de 0, 1, 2 et 3 jours du shRNAmir ciblant TTF-I	48
Figure 19 : Marquages métaboliques des clones A10 et B10 après inductions de 0, 1, 2 et 3 jours	49
Figure 20 : Analyses Western blot des clones A10 et du clone de récupération A10 TTF-I Flag	50
Figure 21 : Marquages métaboliques des clones A10 et A10 TTF-I	51
Figure 22 : Ratio 47S/18S et 32S/18S démontrant une perturbation de la maturation des ARNr	52
Figure 23 : Analyse de ploïdie par FACS, histogrammes et marquages métaboliques correspondant	54
Tableau 1 : Données des analyses de ploïdie par FACS	54

Liste des abréviations

ADNg : ADN génomique
ADNr : ADN ribosomique
ARF : *Alternate reading frame protein*
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
CK2 : *Casein kinase 2*
CDK2 : *Cyclin dependant kinase 2*
CP : *Core promoter*
Cps : Comptes par seconde
CMV : Cytomégalovirus
DFC : *Dense fibrillar center*
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle Medium*
DTA : *Diphtheria toxin A*
ERK : *External signal-regulated kinase*
ES : *Embryonic stem cells*
ETS : *External transcribed region*
FBS : *Fetal bovine serum*
FC : *Fibrillar center*
FLP : *Flipase recombination enzyme*
FRT : *Flipase recognition target*
GC : *Granular center*
GFP : *Green fluorescent protein*
HMGB : *High-mobility group box B*
ICR : *Imprinting control region*
ITS : *Internal transcribed sequence*
kb : Kilobase ou kilobases
LIF : *Leukimia inducible factor*
Neo : Neomycine
NOR : *Nucleolar organization region*
PAF53 : *Polymerase-associated factor 53*
pb : Paire(s) de bases
PBS : *Phosphate buffered saline*
PIC : *Pre-initiation complex*
Pol I : *RNA Polymerase I*
Pol II : *RNA Polymerase II*
Pol III : *RNA Polymerase III*
PTRF : *Polymerase transcript release factor*
Raf : *Ras-associated factor*
RNP : *Ribonucleoprotein*
RPA43 : *RNA polymerase I subunit A43*
Rpm : Révolution(s) par minute
SAP : *Shrimp alkaline phosphatase*
SDS : *Sodium dodecyl sulphate*
shRNAmir : *Short hairpin micro RNA*

SIN : *Self-inactivating*
SL1 : *Selectivity complex 1*
snoRNA : *Small nucleolar RNA*
SSC : *Saline-sodium citrate*
TAF48/63/110 : *TBP-associated factors 48, 63, and 110*
TBP : *TATA-box binding protein*
TBS : *Tris-buffered saline*
TIF-IA : *Transcription initiation factor IA*
TMP : *Tetracycline-regulated retroviral vector- SIN-TREmiR30-PIG*
TTF-I : *Transcription termination factor*
TRE : *Tetrycline-repressed element*
UBF : *Up-stream binding factor*
UCE : *Up-stream core element*

Chapitre 1 Introduction

1.1 Le ribosome

1.1.1 Importance pathologique de la synthèse protéique

Le cycle cellulaire et la division cellulaire sont deux aspects universels qui permettent la croissance et la prolifération chez les cellules eucaryotes. L'exécution de ces processus nécessite une coordination exceptionnelle de la part du métabolisme cellulaire. La régulation fine du cycle et de la division cellulaire permet aux cellules de s'adapter à des fluctuations de la disponibilité des nutriments dans leur milieu et assure leur survie. Par contre, la dérégulation de ces mécanismes peut mener à des anomalies sérieuses, telle l'hyperplasie et le cancer. Le cancer est une pathologie impliquant une dérégulation des contraintes de croissance cellulaire permettant une expansion anarchique des cellules. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans le développement d'une cellule cancéreuse mais une composante clé de son évolution est l'obtention d'un rythme de production protéique accéléré. Sans production protéique renforcée, la cellule ne peut supporter un métabolisme résultant en une croissance accélérée et anarchique comme on la voit chez les cellules tumorales. Le ribosome est l'unité fonctionnelle de la production protéique et est donc primordiale à l'obtention d'une croissance du type tumoral.

En cancérologie, on étudie de plus en plus les mécanismes de régulation de la biosynthèse ribosomique en s'attendant à découvrir un facteur qui permettrait une décélération de celle-ci et la suppression conséquente de la croissance chez les cellules cancéreuses. Par contre, étant donné que la biosynthèse des ribosomes est un processus exceptionnellement complexe, qui est finement et rapidement régulé en réponse à la disponibilité des nutriments et qui crée une demande énergétique et biosynthétique majeure, il existe une panoplie de points où la régulation pourrait avoir lieu. De plus, quoique plusieurs mécanismes de régulation de la biosynthèse ribosomique aient été suggérés et étudiés, ceux-ci demeurent encore plutôt obscurs.

Des études récentes effectuées par MacInnes et al (48) ont également démontré que des animaux portant des mutations hétérozygotes pour certaines protéines ribosomiques étaient incapables à stabiliser p53, ce qui induisait le développement de tumeurs malignes des nerfs périphériques. Les protéines ribosomiques sont capables de se lier à l'inhibiteur de p53, MDM2, ce qui résulte en la stabilisation de p53 (10, 13, 46) ou encore la protéine ribosomique rpL26 est capable de se lier à l'ARNm de p53 et influencer son taux de traduction (95). L'idée que les protéines ribosomiques sont reliées à la stabilisation de p53 n'est donc pas nouvelle. Sachant que p53 est muté chez environ 70% des cancers et que les cancers qui ne montrent pas de mutation chez p53 montrent souvent des défauts dans la chaîne de régulation ARF/MDM2 qui régule les niveaux de p53 (56), il serait intéressant de déterminer comment les protéines impliquées dans la biogénèse des ribosomes réussiraient à réguler le dosage de p53 dans la cellule et ce surtout dans des conditions de stress. Il pourrait s'agir d'un moyen pour traiter les cancers chez lesquels on a toujours la forme sauvage de p53.

1.1.2 La structure du ribosome

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques (RNP), c'est-à-dire qu'ils sont composés d'une combinaison de molécules protéiques et d'acides ribonucléiques. Autant chez les bactéries que chez les eucaryotes, ils assurent la traduction des ARNm en protéines (60) et certaines formes spécialisées de ribosomes sont même présents au niveau des mitochondries et des chloroplastes (60). On les retrouve soit libres dans le cytosol ou attachés à la membrane du réticulum endoplasmique. Chez les eucaryotes, ils ont un coefficient de sédimentation de 80S et sont formés de deux sous unités : la petite (40S) et la grosse (60S) (28, 58). La grosse sous unité ribosomique est composée de trois molécules d'ARNr (ARN ribosomique): le 28S, le 5,8S et le 5S. Ces trois ARNr sont agencées autour de 49 protéines ribosomiques et forment le site catalytique du ribosome. De son côté, la petite sous unité ribosomique est constituée d'une seule molécule d'ARNr, le 18S, et d'environ 33 protéines ribosomiques (28, 58). Quoique le ribosome des bactéries soit très bien défini, plusieurs aspects du ribosome eucaryote restent encore à être caractérisés.

1.1.3 La régulation du ribosome

Cette étude porte principalement sur les mécanismes régulant le nombre de ribosomes disponibles pour la production protéique. Une cellule cancéreuse possède un taux de croissance élevé qui nécessite forcément un taux de synthèse protéique accrue et un plus grand besoin en ribosomes disponibles pour le maintenir. Afin d'augmenter leur nombre de ribosomes, les cellules n'ont que deux recours possibles : de ralentir le rythme de leur dégradation ou d'augmenter le rythme de leur biosynthèse. Par contre, les ribosomes sont des complexes d'une stabilité remarquable, demeurant actifs dans la cellule pendant des semaines, voire des mois, avant d'être ciblés au protéasome pour la dégradation (59). Avec un taux de renouvellement aussi faible, il est évident que la cellule ne réussirait jamais à obtenir une accumulation de ribosomes et une augmentation de la synthèse protéique en diminuant la vitesse de dégradation des ribosomes. La seule option restante est donc d'augmenter leur vitesse de synthèse (59). Les ribosomes sont partagés entre les deux cellules filles lors des divisions cellulaires, conséquemment, afin de doubler son rythme de prolifération, une cellule doit quadrupler son taux de synthèse ribosomique. Par contre, le succès de la cellule à augmenter son rythme de croissance par une augmentation de son taux de synthèse ribosomique dépend de si oui ou non le nombre de ribosomes se trouvant dans la cellule en conditions normales est un facteur limitant de la croissance cellulaire (59).

1.2 La biogenèse des ribosomes

1.2.1 Le nucléole

La biosynthèse des ribosomes est un processus comportant plusieurs étapes se déroulant à l'intérieur de différents compartiments de la cellule. Le tout débute au niveau du nucléole qui est une délimitation non membranaire distincte et prédominante du noyau (67, 81). Observé pour la première fois il a plus de 200 ans, il fut l'une des premières structures nucléaires à être identifiées (66, 81). Ce fut durant les années soixante du siècle dernier qu'on identifia sa fonction principale: la biosynthèse des ribosomes (28, 53, 66). Consistant en un regroupement très dense de molécules d'ARNr et de protéines ribosomiques autour

des gènes ribosomiques, l'existence du nucléole est ultimement dépendante de cette fonction primaire (53, 66, 67, 72). Grâce à sa densité moléculaire élevée, le nucléole est observable en microscopie électronique quand la cellule n'est pas en division cellulaire. Chez les métazoaires, on peut y distinguer trois régions : le centre fibrillaire (FC), la composante fibrillaire dense (DFC) et la composante granulaire (GC) (figure 1).

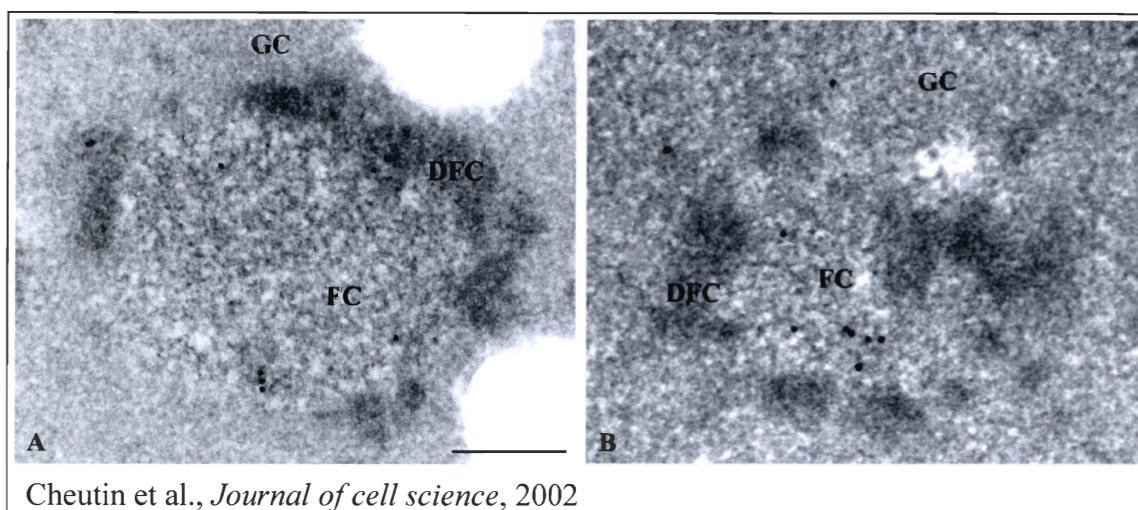


Figure 1. Structure du nucléole. Image de microscopie électronique distinguant les trois régions du nucléole. DFC : Centre fibrillaire dense, FC : Centre fibrillaire, GC : Centre granulaire. Tiré de Cheutin et collaborateurs (11).

Chacune des régions nucléolaires a une composante d'ARNr et de protéines distincte qui correspond aux activités spécifiques du processus de transcription ou de maturation des ARNr qui s'y loge (67, 72). On détecte la PolI (ARN polymérase I) et sa machinerie transcriptionnelle principalement dans le FC ce qui est en accord avec des études qui ont démontré que la transcription de l'ADNr se passe à la limite du FC et du DFC (5, 72, 81). Au niveau du DFC, on retrouve le précurseur des ARNr, les ARNr dérivant de celui-ci et les protéines et snoRNA (petits ARN nucléolaires) impliqués dans la maturation des ARNr (72). Finalement, le GC est principalement composé des ARNr matures et des protéines nécessaires à l'assemblage des sous unités ribosomiques (5, 72). Le nucléole se dissocie à

l'entrée en mitose et se reforme à la fin autour d'amas de répétitions de gènes ribosomiques nommés les régions organisatrices nucléaires (NOR). Un nucléole peut contenir plusieurs NOR (5, 28, 66, 72).

La perception du nucléole est en pleine évolution dans le milieu scientifique. Souvent considéré comme une « usine » de la biosynthèse ribosomique n'ayant aucune conséquence additionnelle au niveau du fonctionnement cellulaire, le nucléole commence peu à peu à être reconnu comme un compartiment impliqué dans une grande gamme de fonctions (81, 99). Il fut récemment démontré par analyse protéomique que, chez les eucaryotes, plus de 700 protéines peuvent se localiser au nucléole et on commence donc à lui attribuer plusieurs fonctions n'ayant aucun rapport direct avec la biogénèse des ribosomes (1, 81). Entre autres, le nucléole jouerait un rôle de senseur de stress cellulaire (65, 75) et aurait également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (99), la différenciation des cellules souches du trophoblaste (49), la réplication des génomes viraux (81) et la régulation de la croissance et du cycle cellulaire des cellules souches (47, 97). Chez *Arabidopsis*, le nucléole aurait même des fonctions concernant l'exportation et la surveillance des ARNm (70). Par contre, la fonction principale du nucléole demeure celle de la biosynthèse des ribosomes. Au niveau clinique, on emploie même le fait que la taille du nucléole varie avec le potentiel prolifératif des cellules afin de prononcer des pronostics chez les patients atteints de cancer. Dans ce cas, un gros nucléole amène un mauvais pronostic parce qu'il reflète un potentiel de prolifération élevé chez les cellules cancéreuses en question (16, 81). En cancérologie, le lien direct entre le nucléole, la biogénèse des ribosomes et le potentiel de prolifération des cellules cancéreuses est de grand intérêt (76). Pour cette raison, plusieurs équipes de recherche cherchent à mieux comprendre le nucléole et le processus de la synthèse ribosomique qu'il régit. La plupart des étapes de la biosynthèse ribosomique sont exécutées dans le nucléole en commençant par la transcription des gènes ribosomiques.

1.2.2 Les gènes ribosomiques

L'ADNr est constitué de plusieurs répétitions en tandem de gènes ribosomiques dont la séquence fait environ 43 kb (kilobases). Dans un génome mammifère haploïde, on estime qu'environ 150-200 répétitions de gènes ribosomiques sont présentes aux constriction secondaires des chromosomes acrocentriques, soient les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (59). L'ADNr autour de laquelle se forment les NOR est maintenue sous une forme condensée qui diffère de l'hétérochromatine typique de l'ADN chromosomique comprenant des nucléosomes. En fait, certaines études suggèrent qu'il n'y ait pas de nucléosomes au niveau de l'ADNr en raison des patrons inhabituels observés après une digestion à la nucléase ou après l'intercalage au psoralène (25). On suggère que le mécanisme de condensation particulier de l'ADNr implique des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADNr (22), la présence de l'histone de liaison H1 (25) ou encore la présence de protéines architecturales qui joueraient le rôle des histones de l'hétérochromatine traditionnelle (84). Il fut également suggéré qu'un homologue possible de l'histone H1 serait responsable d'empêcher la recombinaison de l'ADNr chez la levure (44). Quoique des mécanismes de condensation de l'ADNr différents de ceux de l'ADN génomique en général ont été suggérés, jusqu'ici aucune observation ne permet de conclure que l'hétérochromatine ribosomale diffère véritablement d'autres hétérochromatines. Le mécanisme responsable de la condensation de l'ADNr reste à être caractérisé mais on suppose que celui-ci jouerait aussi un rôle clé dans la détermination de la fraction des gènes ribosomiques qui seront activement transcrits (22, 84). Logiquement, l'état de condensation de l'ADNr pourrait déterminer le niveau d'activité des gènes ribosomiques en empêchant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs ribosomiques (25). En fait, de plus en plus on pense que les gènes ribosomiques existent sous trois formes : une première maintenue inactive en permanence par la méthylation de l'ADNr (Gagnon-Kugler et Moss, résultats non-publiés) et la présence d'histones (55), une deuxième non méthylée qui porte une protéine architecturale (UBF) promouvant la transcription active et continue des gènes (9, 55) et finalement une troisième forme alternant entre un état de transcription actif et supprimé. En phase G1, seule la moitié des NOR est activement transcrite tandis que le reste est maintenu silencieux (59). Le nucléole se forme autour des NOR actifs ainsi qu'autour des NOR inactifs de façon non sélective. On distingue les NOR actifs des NOR

inactifs par la conformation ouverte permissive versus la conformation fermée réfractaire de l'ADNr respectivement (22) ainsi que par la présence des protéines de la machinerie transcriptionnelle de la PolII exclusivement chez les FC des NOR actifs (5, 72, 74, 81).

Une unité de répétition du gène ribosomique est constituée premièrement d'une région qui est transcrite pour donner le précurseur des ARNr matures 18S, 28S et 5,8S de 5' à 3' respectivement (figure 2) (21). À l'intérieur de cette région, les sections correspondant aux ARNr matures sont intercalées par des « internal transcribed sequences » (ITS) et les séquences des ARNr 18S et 5,8S sont flanquées par des « external transcribed regions » (ETS) en 5' et 3' respectivement. Ces séquences créent une structure tridimensionnelle dans l'ADNr qui est essentielle à la reconnaissance et à l'exécution des fonctions d'enzymes impliqués dans la maturation des ARNr. La transcription de cette région du gène ribosomique est gérée par le promoteur ribosomique qui se trouve en amont. Le promoteur ribosomique s'étend de la position -167 à la position +6 du gène par rapport au site d'initiation de la transcription. Les séquences des promoteurs ribosomiques diffèrent beaucoup d'un groupe taxonomique à l'autre. Par contre, la majorité des promoteurs ribosomiques contient deux éléments fonctionnels qui demeurent d'une espèce à l'autre quoique pas toujours 100 % homologues : le « proximal core promotor » (CP) et le « upstream control element » (UCE) (59). L'initiation de la transcription *in vivo* dépend de l'intégrité de ces deux séquences ainsi que de l'espace qui les sépare (25). Chez les mammifères, le UCE se situe entre les positions -167 et -50 et le CP entre les positions -31 et +6. L'altération de la longueur de la séquence séparant les deux éléments affecte l'efficacité du promoteur (77). L'importance du positionnement physique juste de ces éléments du promoteur pourrait être expliquée par leur interaction simultanée avec le « Upstream Binding Factor » (UBF). Selon les hypothèses actuelles, UBF est un facteur architectural qui interagirait à la fois avec le CP et le UCE pour former une structure tridimensionnelle facilitant le recrutement et la stabilisation du complexe d'initiation de la transcription PolII à l'ADNr (87). Ce rôle d'UBF dans l'initiation de la transcription ribosomique sera discuté plus loin au cours du mémoire.

En aval de la région transcrite du gène ribosomique et s'étendant jusqu'au promoteur de la prochaine répétition se trouve une région non transcrite d'environ 30 kb dénommé l'espaceur intergénique (« intergenic spacer », IGS) (57). Le IGS est essentiel pour la transcription ribosomique efficace (15). Le IGS contient une panoplie de séquences qui gèrent la transcription des gènes ribosomiques par des interactions avec le promoteur ou encore assurant des fonctions clés comme l'ouverture de l'ADNr pour l'initiation ou la terminaison de la transcription. On y retrouve les régions promotrices (« enhancer »), le promoteur de l'espaceur intergénique (« spacer promoter »), une origine de réplication intergénique (58), des séquences barrant la fourche de réplication pour éviter la transcription bidirectionnelle de l'ADNr (19) et les terminateurs de la transcription ribosomique et intergénique (21). Il y a de la transcription qui est effectuée à l'intérieur de l'espaceur intergénique (14) dont la fonction reste inconnue à ce jour.

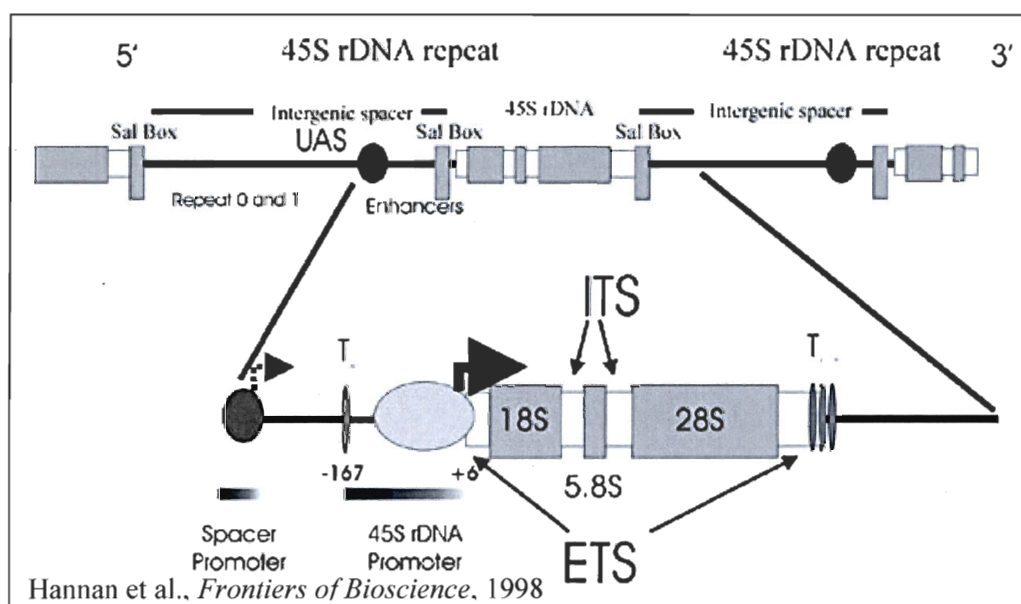


Figure 2. Représentation schématique d'une répétition du gène ribosomique. ETS : *External transcribed region*, ITS : *Internal transcribed region*. Tiré de Hannan et collaborateurs (25).

Chez les mammifères, les terminateurs de la transcription ribosomique, nommés les « Sal box », sont typiquement des motifs de 17 paires de bases (pb) qui sont associés à la terminaison de la transcription (25). Ces séquences sont des sites de liaison spécifiques pour le « transcription termination factor » (TTF-I) qui cause l'arrêt du cheminement du complexe d'élongation de la PolII (19). Un amas de dix « Sal box » en 3' du dernier ETS de la région transcrite forme les « downstream promoter terminator elements » (T_1 - T_{10}). Ces « Sal box », de concert avec une séquence riche en thymidine se trouvant en amont des Sal box ainsi qu'avec une protéine transactivatrice (32), assurent la terminaison de la transcription déclenchée à la position +1 et dépendant du promoteur ribosomique (25). En amont du promoteur ribosomique, on retrouve une séquence unique de 13 pb qui est également un « Sal box » et qu'on a dénommé le « promoter proximal terminator element » (T_0). Le T_0 s'étend entre les positions -180 et -167, directement en 5' du promoteur ribosomique et agit comme terminateur des transcrits provenant du promoteur de l'espace intergénique (25, 58) (figure 2). La fonction des transcrits provenant de la transcription intergénique demeure inconnue. Malgré les fonctions traditionnelles de terminateurs que l'on attribue aux « Sal box », il semble de plus en plus évident que le T_0 a une multitude de fonctions de par son interaction avec TTF-I plutôt que de jouer exclusivement le rôle de terminateur de la transcription (25, 61, 92). Le rôle des fonctions de TTF-I dans la transcription ribosomique demeure encore quelque peu flou. Les nombreuses fonctions de TTF-I seront discutées plus loin.

1.2.3 La transcription ribosomique

La transcription ribosomique consiste en la synthèse de l'ADNr et la formation conséquente du précurseur des ARNr : l'ARN 47S. Il s'agit de l'étape initiale de la biosynthèse des ribosomes. Combinées, la transcription et la maturation des ARNr requièrent une énorme quantité d'énergie et de ressources et nécessitent la participation et la régulation coordonnée de trois machineries transcriptionnelles. Premièrement, la machinerie de la PolII est responsable de la transcription de l'ADNr pour synthétiser le précurseur des ARNr (pre-ARNr : 47S chez les mammifères, 35S chez la levure). Chez la levure, la transcription catalysée par la PolII compte pour environ 60% de l'activité

transcriptionnelle totale de la cellule (55) et les ARNr constitue environ 80% des ARN stables totaux (58). Deuxièmement, l'ARN polymérase II (PolII) catalyse la transcription des ARN messagers (ARNm) qui codent pour les protéines ribosomiques ainsi que certains facteurs non ribosomiques nécessaires pour la biosynthèse des ribosomes (8). Et, finalement, l'ARN polymérase III (PolIII) catalyse la transcription de l'ARNr 5S et des « small nucleolar RNAs » (snoRNA) qui guident les maintes étapes de clivage du pre-ARNr lors de la maturation des ARNr en promouvant la reconnaissance de certains sites de clivage par les enzymes catalytiques (102).

Le taux de synthèse des ARNr est lié à la croissance et la prolifération cellulaire (90). En fait, plusieurs processus physiologiques nécessitent une variation du rythme de croissance cellulaire qui est accompagnée d'une variation du taux de transcription ribosomique et de la grosseur et du nombre de nucléoles présents dans le noyau : la régénération d'organes (17), la différenciation cellulaire (91, 104), l'hypertrophie (27), le vieillissement (6) ou encore la carence en nutriments (23). Conséquemment, si dérégulée, la transcription ribosomique peut jouer un rôle clé dans le développement de pathologies hyperplasiques comme le cancer. La réponse du cycle cellulaire face à une variation du taux de synthèse de l'ARN 47S est d'une telle rapidité que l'on qualifie les gènes ribosomiques de gènes à réponse rapide ou IEG (« Immediate Early Genes ») (90), comme c-myc, c-fos, c-jun et d'autres encore. La transcription ribosomique comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La régulation du mécanisme est surtout obtenue en modérant la vitesse d'exécution de l'initiation et l'élongation (58) d'où l'importance de définir les protéines impliquées lors de chacune de ces étapes et leurs fonctions.

1.2.3.1 L'initiation de la transcription ribosomique

L'initiation de la transcription est considérée comme l'étape limitante de la synthèse de l'ARN 47S et, conséquemment, l'étape la plus apte à jouer un rôle dans la régulation du taux de biogenèse ribosomique (61). Cependant, la vitesse d'élongation de la PolI sur l'ADNr est également un mécanisme ciblé pour obtenir une régulation du taux de synthèse des ARNr (84).

L'initiation de la transcription dépend premièrement de la formation du complexe de pré initiation (PIC) consistant en UBF sous forme de dimères et du complexe d'initiation « selectivity factor 1 » ou SL1 (58). La liaison d'UBF au CP et au UCE du promoteur était considérée comme la première étape de l'initiation de la transcription ribosomique (60) mais, plus récemment, ceci fut remis en question (18, 58). Le model originellement décrit suggérait que la structure UBF/promoteur était permissive au recrutement du complexe SL1 et surtout à la stabilisation du PIC sur le promoteur (3, 33, 34). L'interaction entre le dimère UBF et le promoteur permettrait le pliage d'environ 140 pb d'ADNr dans une boucle de 360 degrés et la formation d'une structure tridimensionnelle nommé l'enhancesome (87) (figures 3A et 3B). Cette structure pourrait expliquer par quel moyen le complexe SL1 est capable de se lier à la fois aux deux éléments UCE et CE (2, 88). En fait, il fut démontré qu'une surexpression d'UBF est suffisante pour voir une augmentation de la transcription ribosomique (26, 90). Le complexe SL1 est composé de la TBP (« TATA-box binding protein ») et de trois TAF (« TBP-associated factors ») qui, chez l'humain, sont nommés TAF48, TAF63 et TAF110, d'après leurs masses moléculaires respectives (58, 77). La formation du PIC, donc le recrutement du complexe SL1 au promoteur, est permis par la phosphorylation de la queue C-terminale acide d'UBF. Cette phosphorylation est reconnue par le complexe SL1 qui est ainsi recruté au promoteur (98). Suite à la stabilisation du PIC sur le promoteur, il y a recrutement du complexe PolII par une interaction entre UBF et PAF53 (« polymerase associated factor 53 ») et formation du complexe d'initiation (54). L'interaction entre UBF et PAF53 est modulé par l'acétylation d'UBF (54).

Le complexe de la PolII se compose de 12 à 14 sous unités dont PAF53, RPA43 (« RNA polymerase I subunit A43 »), et Rrn3, un facteur d'initiation spécifique à la PolII et homologue aux facteurs TIF-IA (« transcription initiation factor IA ») chez la souris et Rrn3p chez l'humain et la levure (58). Rrn3 interagit directement avec le complexe de la PolII et est essentiel à l'initiation de la transcription par PolII (58, 79). L'association de Rrn3 avec la polymérase est déterminante de la capacité du complexe d'effectuer l'initiation de la transcription et dépend de la phosphorylation de Rrn3 même (58, 79). En fait, on retrouve deux formes du complexe PolII : une forme compétente à l'initiation associée avec

Rrn3, et une forme non compétente à l'initiation non associée à Rrn3 (58). Une fois l'initiation effectuée et l'élongation entamée, Rrn3 est relâché du complexe qui devient alors un complexe d'élongation plutôt qu'un complexe d'initiation. Par contre, le relâchement de Rrn3 du complexe PolI n'est pas essentiel au déroulement normal de l'élongation (58).

1.2.3.2 L'élongation de la transcription ribosomique

Une fois que le complexe de la PolI est en cours d'élongation, sa vitesse peut être modulée par certains éléments liés à l'ADNr qui influent sur la structure de la chromatine aux niveaux des gènes ribosomiques (58). UBF est un tel élément. Quoique reconnu pour son rôle dans la stabilisation du PIC, UBF se lie sur toute la longueur du gène ribosomique et il y a donc formation de l'enhancesome au niveau des gènes ribosomiques entiers de façon non spécifique (64). La présence de l'enhancesome sur l'ADNr inhibe l'élongation de la transcription (84). Par contre, la phosphorylation par ERK (« external signal-regulated kinase ») des boîtes HMG1 1 et 2 d'UBF empêche leur interaction avec l'ADNr et donc le pliage efficace et complet de l'enhancesome. Le dépliage de l'enhancesome permet le passage de la PolI sur les gènes ribosomiques (84) (figure 3C). Conséquemment, la phosphorylation ERK d'UBF est un mécanisme de régulation de la vitesse d'élongation de la transcription ribosomique.

1.2.3.3 La terminaison de la transcription ribosomique

Il est premièrement important de noter que, jusqu'ici, le processus de terminaison de la PolI a seulement été analysé par expérimentation effectuée *in vitro*.

La terminaison de la transcription par la PolI se déroule de manière semblable à celle de la transcription par la PolII. Cependant, la terminaison par la PolII est souvent associée à un clivage autocatalytique ou encore à une activité exonucléasique suite au clivage au niveau de la queue polyA et au relâchement du pré-mRNA, ce qui n'est pas le cas pour la PolI (35, 103). La terminaison de la transcription ribosomique est exécutée en trois étapes : l'arrêt du

complexe PolII, le relâchement du complexe PolII et du nouveau transcrit, et finalement, une étape primaire de la maturation de l'extrémité 3' de l'ARN 47S (38). Comme décrit plus tôt, les 10 séquences « Sal box » composant le terminateur de la transcription ribosomique, le T₁-T₁₀, se situent en aval de la région correspondant au précurseur des ARNr. Lors de la terminaison par la PolII, on a premièrement la liaison d'un facteur de terminaison à la

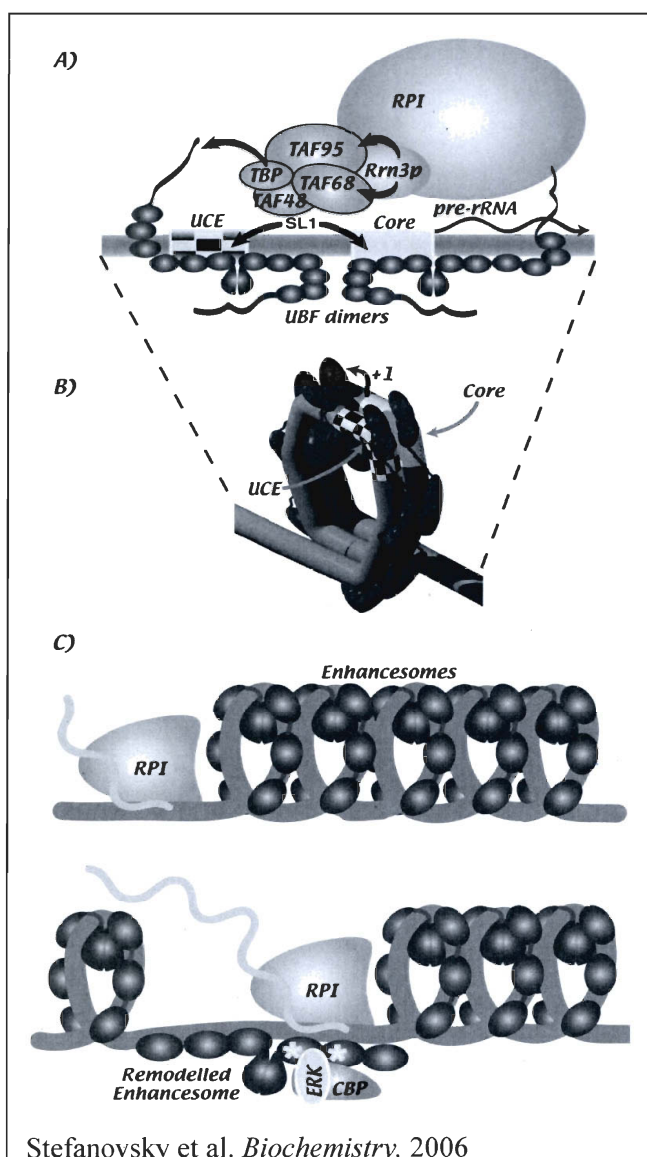


Figure 3. Structure de l'enhancesome et ses rôles dans l'initiation et l'élongation de la transcription ribosomique. A) Liaison du dimère d'UBF sur les éléments UCE et CE (core), recrutement du complexe SL1 et formation du PIC au promoteur. B) Structure de l'enhancesome. Le dimère d'UBF forme une boucle de 360 degrés avec un fragment du promoteur de 140 pb. C) Rôle de la phosphorylation par ERK de l'enhancesome dans l'élongation de la transcription ribosomique. La phosphorylation par ERK d'UBF déplie l'enhancesome et celui-ci devient plus permissif au passage du complexe de la PolII. Tiré de Stefanovsky et collaborateur (83).

séquence terminatrice T₁-T₁₀, ce qui induit l'arrêt sur le brin d'ADNr mais pas le détachement du complexe PolI. La deuxième étape de la terminaison requiert l'action d'un facteur protéique, le « polymerase and transcript release factor » (PTRF), et d'une séquence encadrante riche en thymidine qui se trouve en amont de l'élément terminateur T₁-T₁₀. Le recrutement de PTRF se fait par une interaction avec la grande sous unité du complexe PolI et après l'arrêt de celle-ci au niveau du site de liaison de TTF-I (50). PTRF induit alors le détachement du complexe PolI de l'ADNr ainsi que le relâchement de l'ARNr nouvellement synthétisé (32). La maturation de l'ARN 47S débute pendant l'élongation, donc alors que celui-ci est en cours de synthèse. Cette observation mena à la démonstration que le déroulement même de l'élongation de la transcription PolI (pauses et relâchements spécifiques) a un rôle à jouer dans l'exécution efficace du processus de maturation des ARNr (80). Comme mentionné plus haut, chez la souris, le facteur se liant au terminateur T₁-T₁₀ est TTF-I et le facteur du relâchement de la polymérase et de l'ARNr est PTRF (31, 50). PTRF orchestre le désengagement du complexe de la PolI de l'ADNr en conjonction avec une séquence encadrante riche en thymidine. Ce mécanisme de terminaison est conservé chez la levure où l'orthologue de TTF-I serait Reb1 (51).

1.2.4 La maturation des ARNr

La maturation des ARNr est le processus par lequel le précurseur des ARNr, l'ARN 47S, subit une multitude de clivages exonucléasiques ainsi qu'endonucléasiques pour former trois ARNr matures : le 18S, le 28S et le 5,8S. Cette transformation de l'ARN 47S est catalysée par plusieurs complexes snoRNA/protéines (snoRNP). Comme mentionné ci-dessus, la maturation de l'ARN 47S débute lorsque celui-ci est encore en cours de synthèse, pendant l'élongation catalysée par la PolI, et le processus de maturation efficace des ARNr est en quelque sorte dépendante du déroulement de l'élongation de la transcription (80). Par contre, une fois l'élongation et la terminaison de la transcription ribosomique effectués et le 47S relâché dans le DFC du nucléole, les étapes majeures de la maturation consistent en deux clivages consécutifs. Il y a d'abord le clivage initial de l'ARN 47S qui a lieu dans le DFC et résulte en la formation de l'ARN 18S et d'un deuxième précurseur, l'ARN 32S. Ces deux ARNr sont alors transférés au GC où l'ARN 32S subit un deuxième clivage,

probablement catalysé par la protéine ribosomique B23, pour former le deuxième et le troisième ARNr matures, soit les ARN 5,8S et 28S. Le quatrième et dernier ARNr, l'ARN 5S, est synthétisé en périphérie du nucléole par la PolIII. Il est ensuite importé dans le nucléole et assemblé avec les ARN 5,8S et 28S et environ 49 protéines ribosomiques pour former la grande sous unité ribosomique : la 60S. De son côté, l'ARN 18S est assemblé avec environ 33 protéines ribosomiques pour former la petite sous unité ribosomique : la 40S. Les deux sous unités ribosomiques sont ensuite exportées du nucléole jusqu'au cytoplasme par des mécanismes indépendants et sont finalement assemblés pour former un ribosome fonctionnel (figure 4) (5).

La description ci-dessus du processus de maturation des ARNr n'est pas exhaustive parce qu'elle ne comprend pas toutes les étapes du processus qu'on pourrait considérer mineures. Une description plus exhaustive de la maturation des ARNr est représentée sous dans le schéma de la figure 5.

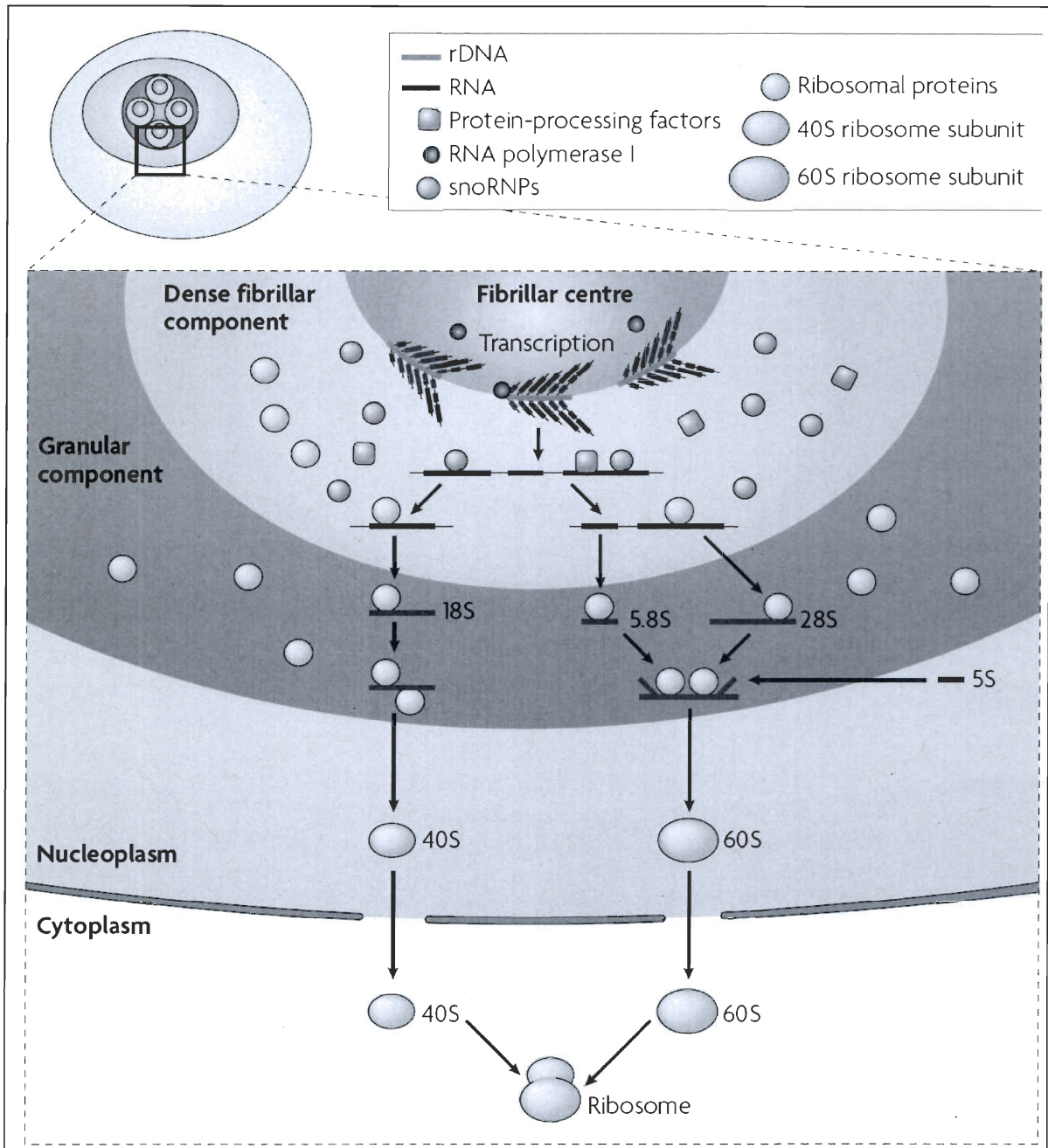


Figure 4. Déroulement de la biogenèse ribosomique à travers les différents compartiments nucléolaires. La transcription se fait en périphérie du FC et DFC, les clivages majeurs sont effectués dans le DFC et l'assemblage se fait au niveau de GFC.

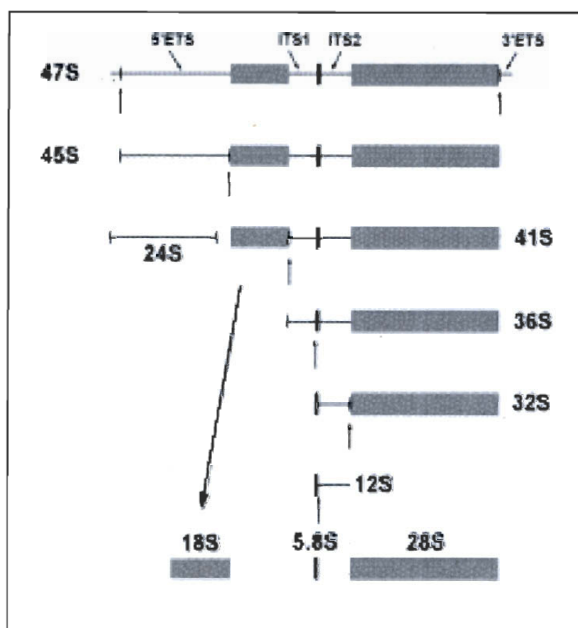


Figure 5. Maturation des ARNr. Représentation schématique des étapes de la maturation des ARNr incluant les étapes secondaires. Tous les précurseurs et les divers sites de clivage sont indiqués. Tiré de Sugimoto et collaborateurs (93).

1.3 La régulation de la biosynthèse ribosomique

La vitesse de production des ribosomes est en corrélation directe et rapide avec la vitesse de croissance et de prolifération des cellules (42). Il est donc évident que des maladies d'hyperprolifération cellulaire, tel le cancer, pourraient impliquer des mécanismes de régulation de la biosynthèse ribosomique. La régulation de la production de ribosomes peut théoriquement se faire au niveau de la transcription ribosomique, de la maturation des ARNr ou de l'assemblage et du transport des sous unités ribosomiques (42, 58, 85). Ces différents processus peuvent être gouvernés par la modulation des niveaux d'expression, des modifications post traductionnelles ou du transport de facteurs qui leurs sont nécessaires (figure 6) (42).

Quoiqu'il y ait plusieurs étapes pouvant jouer un rôle dans la régulation de la biogenèse ribosomique, le processus est surtout gouverné par la modulation de la vitesse de transcription (25, 42). Ce type de régulation implique forcément, soit une modulation du nombre de gènes ribosomiques activement transcrits, soit une augmentation ou une

diminution la vitesse d'initiation ou d'élongation de la transcription par PolII (25, 42, 85). En fait, la régulation de la vitesse de synthèse de l'ARN 47S semble dépendre énormément du remodelage de la chromatine qui contrôle l'accessibilité de l'ADNr par des mécanismes variables (55, 62).

Comme les gènes ribosomiques sont très nombreux, seul environ la moitié de ceux-ci sont activement transcrits alors que l'autre moitié est maintenue supprimée par une structure chromatinienne condensée (58, 62). Conséquemment, en théorie, des changements dans la structure chromatinienne pourraient mener à l'ouverture de gènes auxquels les facteurs de la machinerie transcriptionnelle de la PolII n'avaient pas accès auparavant. Il y a alors plus de gènes ouverts à la transcription et plus de production d'ARN 47S (25, 58). Par contre, le nombre des gènes actifs ne varie ni après une stimulation de la croissance cellulaire par le EGF (« endothelial growth factor »), ni après une activation directe de Raf (« Ras-associated factor ») et hyperacétylation de la chromatine ni après une inhibition de la signalisation de la MAP-kinase (85). La régulation de la synthèse des ARNr ne semble donc pas se faire par une variation du nombre de gènes ribosomiques activement transcrits quoique l'inverse fût suggéré pour des cellules en phase de différenciation (Hannan, R., communication personnelle).

Le remodelage de la chromatine peut également contrôler l'initiation et l'élongation de la transcription ribosomique en limitant ou promouvant l'accès des facteurs de la machinerie PolII aux promoteurs ribosomiques ou aux gènes ribosomiques entiers. Par son interaction avec le terminateur T_0 , TTF-I est capable de recruter des complexes tels NoRC et HDAC qui sont capables d'induire des modifications du degré de condensation de la chromatine au niveau des promoteurs ribosomiques (41). Au niveau de la régulation de l'élongation, des dimères d'UBF forment des enhancesomes le long des gènes ribosomiques qui nuisent au passage de la PolII (87). Par contre, lorsque UBF est phosphorylé par ERK au niveau de la boîte HMG1 1 et 2, la structure de l'enhancesome est dépliée et le passage de la PolII est facilité. Il s'agit alors d'un moyen de contrôler le passage du complexe PolII sur le l'ADNr et conséquemment la vitesse d'élongation de la transcription ribosomique

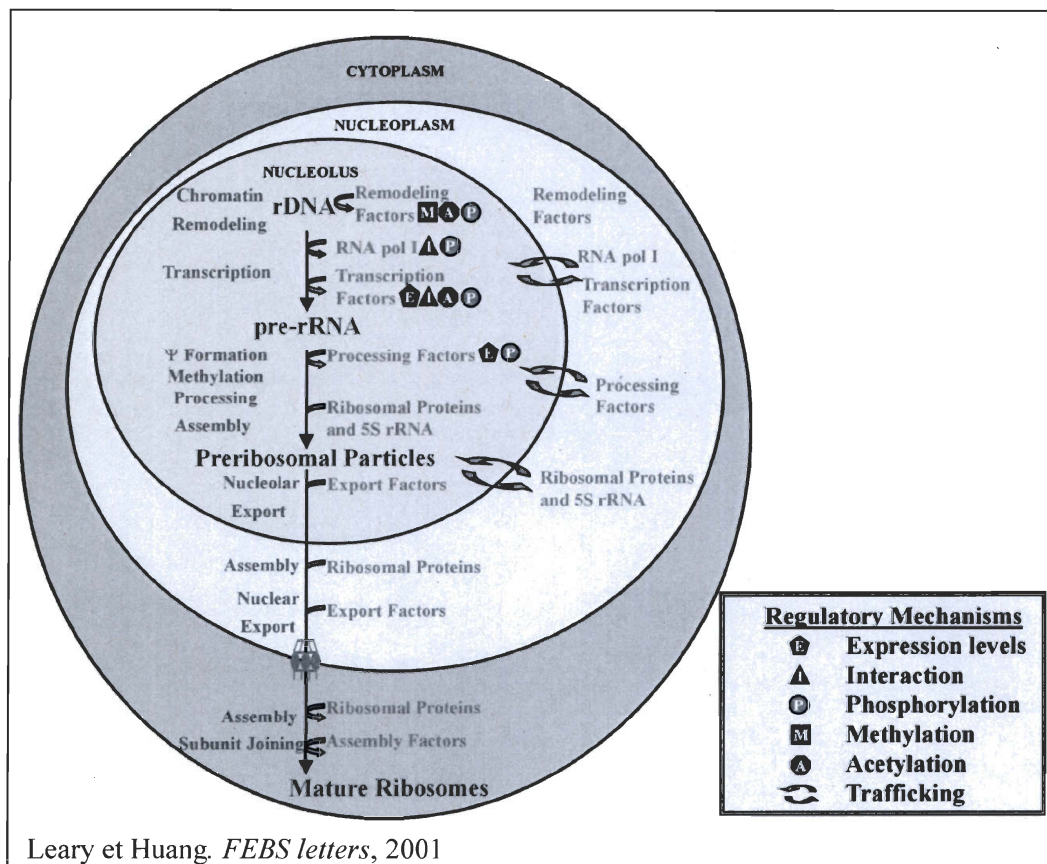


Figure 6. Mécanismes potentiels de la régulation de la biogenèse ribosomique à travers les compartiments de la cellule. Tiré de Leary et Huang (42).

(83, 87). Il s'agit là de seulement un de plusieurs mécanismes de régulation de la synthèse de l'ARN 47S par des modifications post traductionnelles d'UBF et le remodelage de la chromatine (69).

Étant donné l'implication d'UBF et de TTF-I dans la régulation du taux de synthèse de l'ARN 47S et, conséquemment, dans la vitesse de biosynthèse ribosomique, j'ai étudié ces deux facteurs de transcription par deux approches indépendantes : l'inactivation génique et l'interférence à l'ARN. Dans les prochains chapitres, mes démarches expérimentales ainsi que mes résultats et conclusions seront présentés. Par contre, une introduction couvrant ce

qui est connu concernant les facteurs de transcription ribosomique UBF et TTF-I ainsi que les axes de recherches entreprises dans le cadre de mes études à la maîtrise précédera les démarches expérimentales.

1.4 UBF

1.4.1 Structure

UBF est une protéine nucléolaire appartenant à la famille des protéines à boîtes HMGB (« High-mobility group box B » également nommés HMG-1) (33). Les protéines appartenant à cette famille sont capables de se lier à l'ADN et moduler sa structure (29) et sont conséquemment nommées des protéines architecturales de l'ADN (96). Leur capacité de plier l'ADN, de juxtaposer des séquences de contrôle et de faciliter le remodelage des nucléosomes suggère qu'elles jouent un rôle dynamique dans l'organisation de la chromatine (96).

UBF porte six boîtes HMGB dont seules les trois premières en partant de l'extrémité N-terminale sont nécessaires au pliage de l'enhancesome (88). UBF a un domaine de dimerisation en N-terminal et une queue C-terminal acide. Le domaine de dimerisation, comme son nom l'indique, est essentiel pour la dimerisation de la protéine, ce qui est nécessaire pour la formation efficace de l'enhancesome sur l'ADNr (89). Conséquemment, le domaine de dimerisation et les trois boîtes HMGB N-terminales sont nécessaires et suffisants pour obtenir la structure de l'enhancesome sur l'ADNr (34, 52, 94). De l'autre côté, la queue acide en C-terminale, lorsque phosphorylée, est reconnue par certaines protéines et permet le recrutement de complexes, tel SL1, lors de l'initiation de la transcription (98) (figure 7). Il existe deux isoformes de la protéine, UBF1 de 97 kDa et UBF2 de 94 kDa. Ces deux formes résultent d'un épissage alternatif et diffèrent l'une de l'autre due à une délétion dans UBF2 de 37 acides aminés dans le deuxième motif HMGB (40, 63). Comme ce domaine est essentiel à l'activité de liaison à l'ADN ainsi qu'à l'activité transcriptionnelle d'UBF, il s'agit d'une différence structurelle qui détermine la fonction de la protéine (26, 40, 86).

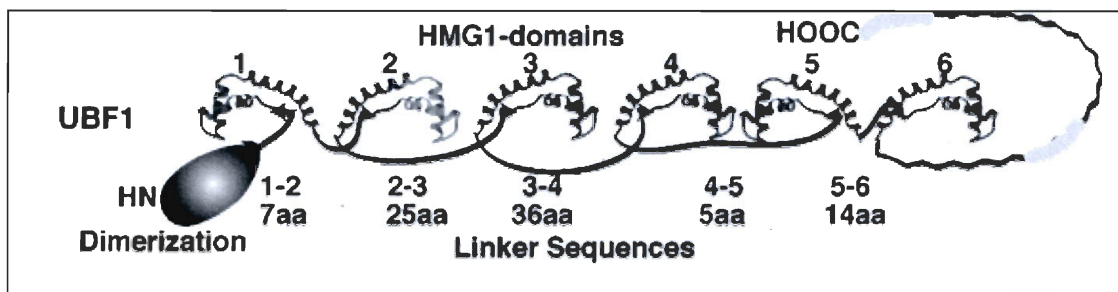


Figure 7. Structure d'UBF. On y voit les 6 boîtes HMGB ainsi que le domaine de dimérisation en N-terminal et la queue acide en C-terminal. Les boîtes HMGB 1 à 3 sont nécessaires pour le pliage de l'enhancesome tandis que seules les boîtes 1 et 2 sont nécessaires à la liaison à l'ADNr. Le domaine de dimérisation est essentiel à la formation de l'enhancesome et la queue acide est importante pour le recrutement du complexe SL1 au promoteur. En vert on voit la région dont la présence ou l'absence dépend de l'épissage alternatif.

1.4.2 Fonctions

Les rôles attribués à UBF, comme décrit plus haut, sont ceux d'amplificateur ou de « enhancer » de l'initiation et de l'élongation de la transcription ribosomique. La structure de l'enhancesome au niveau des promoteurs promouvoit le recrutement de SL1 et, répartie tout le long des gènes, il détermine fort probablement s'ils sont activement transcrits et régule l'élongation de la PolII. En fait, une simple surexpression de UBF résulte en une augmentation de la transcription ribosomique (27). UBF est impliqué dans un très grand nombre de mécanismes de réponse aux facteurs de croissance. Par exemple, il est un joueur clé dans la régulation la synthèse de l'ARN 47S en réponse à des variations dans la vitesse de croissance cellulaire et du besoin protéique (58).

Grâce à maintes études effectuées *in vitro*, il a été démontré que UBF est capable d'activer la transcription par la PolII *in vitro* au niveau de la pré-initiation (34) ou encore au niveau du relâchement du promoteur (68). Il a également été démontré qu'UBF peut lever la

suppression de la transcription découlant de la présence de l'histone H1 sur l'ADNr (39). Et puis, finalement, Smith et collaborateurs (82) ont mis en évidence qu'UBF n'est pas nécessaire pour la transcription *in vitro* (82). Aussi, UBF a une capacité de se lier à presque n'importe quelle séquence d'ADN de façon non spécifique grâce à ces six boîtes HMGB (12, 43). Ces deux caractéristiques d'UBF font douter de la validité des résultats obtenus par expérimentation effectuée *in vitro*. En fait, il fut démontré qu'UBF n'était pas nécessaire au recrutement du complexe SL1 sur le promoteur ribosomique et que c'était même SL1 qui jouait le rôle de stabiliser UBF sur l'ADNr en induisant une structure tridimensionnelle dans l'hélice d'ADNr qui aurait plus d'affinité pour UBF (18). Cette hypothèse concorde avec le fait qu'UBF se lie de façon non spécifique à l'ADNr car si son rôle primordial était le recrutement de SL1 au promoteur, on aurait cru y voir une certaine spécificité à la liaison aux promoteurs ribosomiques.

1.4.3 Régulation

La modulation de l'activité d'UBF est effectuée autant par des modifications post traductionnelles que par la régulation du niveau de la protéine.

Les niveaux d'UBF peuvent être contrôlés en modulant le niveau de traduction de son ARNm. Un mécanisme connu pour contrôler l'expression d'UBF est celui des facteurs de transcription de la famille MAX. Cette famille regroupe des protéines du type bHLH-Zip (« basic helix-loop-helix leucine zipper») qui s'associent en homodimers ou en hétérodimers pour compétitionner pour leurs sites de liaison et soit supprimer ou stimuler l'expression des gènes cibles selon la nature du dimer formé (20). L'inhibiteur MAD1 et l'activateur c-Myc s'antagonisent et compétitionnent pour former des hétérodimers avec MAX et affectent le niveau d'expression d'UBF ainsi que le niveau de transcription de l'ADNr (71).

Du côté des modifications post traductionnelles, UBF est phosphorylé par ERK (90) mais aussi par les complexes cyclinD1/CDK4 et cyclinE/CDK2 ainsi que par la caséine kinase II (CK2) et S6K1 (24, 98, 100, 101). Lorsque UBF est phosphorylé par ERK au niveau de ses boîtes HMGB 1 et 2, la structure de l'enhancesome est compromise et l'élongation en profite (89). La phosphorylation par CK2 facilite la stabilisation du complexe SL1 sur le promoteur ribosomique (45). De plus, l'acétylation des deux premières boîtes N-terminales HMGB d'UBF par le recrutement de CBP (« CREB-binding protein ») semble également être un mécanisme de régulation de la transcription ribosomique. Cette acétylation module la capacité d'UBF de recruter le complexe PolII au site d'initiation en permettant son interaction avec PAF53 (54). UBF peut également recruter la protéine de pRb (« retinoblastoma protein ») (7) ce qui induit sa désacétylation et l'inhibition du recrutement de la PolII au promoteur (69). Par le biais de recrutement compétitif, CBP et pRb déterminent l'état d'acétylation d'UBF et son interaction avec PAF53 (54, 69).

Étant donné l'importance d'UBF dans le cadre de l'initiation et de l'élongation de la transcription ribosomique, depuis longtemps on présume que cette protéine est absolument nécessaire pour la survie cellulaire. Par contre, il existe des données qui suggèrent qu'UBF n'est pas nécessaire à l'initiation de la transcription (Hannan, communication personnelle) et à la survie cellulaire (Sanij et collaborateurs, manuscrit sous révision). Afin d'obtenir une réponse définitive à la question de la nécessité d'UBF au niveau cellulaire ainsi qu'au niveau de l'organisme, nous avons entrepris la génération d'un modèle murin d'inactivation conditionnelle du gène codant pour UBF.

1.5 TTF-I

1.5.1 Structure

Il est important de noter que tout ce que l'on connaît sur TTF-I à ce jour dérive d'analyses expérimentales exécutées *in vitro*.

Le facteur de terminaison de la transcription ribosomique, TTF-I, est une protéine de 859 acides aminés. On y trouve deux domaines de liaison à l'ADN en son extrémité C-terminale. Ce type de doublet de domaines de liaison à l'ADN a premièrement été observé dans la protéine c-myb et c'est pour cette raison qu'ils sont nommés « myb-like domains »(62). Comme toutes les fonctions de TTF-I dépendent de la capacité de la protéine de se lier à l'ADN et plus spécifiquement aux séquences « Sal box » de l'ADNr, ces « myb-like domains » sont absolument essentiels au bon fonctionnement de la protéine. De l'autre côté, en N-terminal de TTF-I, on retrouve un domaine nommé NTRD pour « N-Terminal Repression Domain »(62). Lorsque la structure de TTF-I est repliée sur elle-même, le NTRD recouvre les domaines de liaison à l'ADN et inhibe la liaison de l'extrémité C-terminale aux séquences « Sal box » du gène ribosomique. De par ce mécanisme, TTF-I peut s'offrir un certain niveau d'autorégulation (figure 8). TTF-I est majoritairement nucléolaire mais se trouve également dans le nucléoplasme et le cytoplasme à des niveaux plus faibles (62).

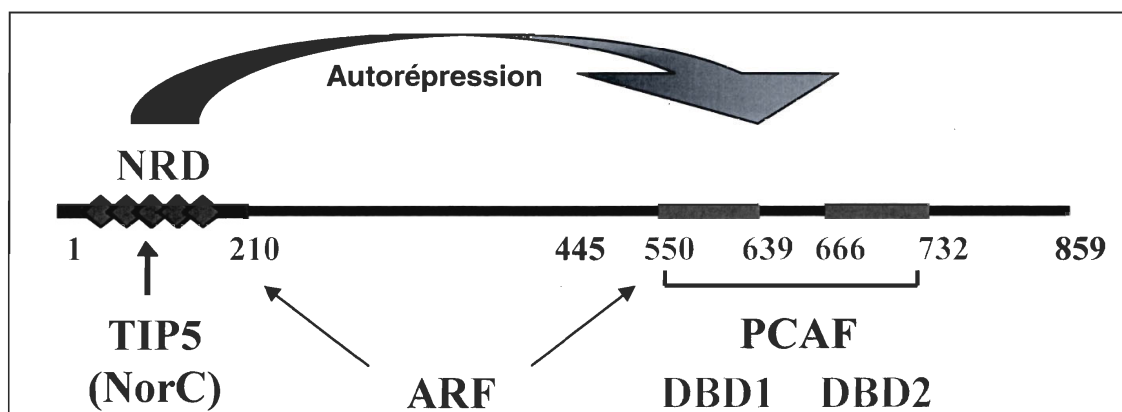


Figure 8. Structure de TTF-I. On voit les « myb-like domains » (DBD1 et DBD2) en C-terminal ainsi que le domaine d'auto-répression en N-terminal (NRD) qui peut se replier sur les domaines de liaison à l'ADN et empêcher la protéine d'accomplir ses fonctions dépendantes de la liaison à l'ADN (62). On voit également les sites d'interaction avec TIP5, un membre du complexe de remodelage de la chromatine NorC capable d'induire la fermeture de la chromatine (62, 78, 92), PCAF, une histone acétylase capable

d'induire l'ouverture de la chromatine (78), et ARF (« alternate reading frame protein »), un suppresseur de tumeur connu pour son implication dans la stabilisation de p53.

1.5.2 Fonctions

Les fonctions qui ont été attribuées à TTF-I impliquent qu'il s'agirait à la fois de la protéine capable d'induire la terminaison de la transcription de la PolII et de remodeler la chromatine ribosomique. Comme décrit ci-dessus, la terminaison de la transcription se fait lorsque la PolII pause après son entrée en contact avec TTF-I lié au terminateur T₁-T₁₀. Il semblerait que TTF-I soit capable simultanément d'exercer une activité antihélicase pour empêcher la collision entre les fourches de réplication et de transcription (73). Il y a alors recrutement de PTRF par son interaction avec la grande sous-unité du complexe PolII pour induire le relâchement du transcrit et du complexe de la PolII de l'ADNr. Il s'agit là de la fonction classique de TTF-I, d'où il tire son nom. La fonction de remodelleur de chromatine attribuée à TTF-I dépend de sa liaison avec la séquence terminatrice de la transcription, le T₀, qui se situe directement en amont du promoteur ribosomique. Après s'être lié au T₀, TTF-I est capable de recruter le complexe NoRC (« nucleolar remodeling complex ») qui serait le remodelleur de chromatine responsable du « silencing » d'environ la moitié des gènes ribosomiques (78, 92). De par le recrutement de DNMT1/3 (« DNA méthyltransférase ») ou de HDAC1 (« histone déacétylase »), NoRC induit l'hyperméthylation de l'ADNr et l'hypo-acétylation des nucléosomes avoisinants et diminue grandement l'accès des facteurs de transcription au promoteur ribosomique (78). Par contre, TTF-I peut également recruter PCAF (« p300/CBP-associated factor »), une histone acétyltransférase qui induit la décondensation de la structure chromatinienne au niveau du promoteur ribosomique et qui augmente l'exposition de ce dernier aux facteurs de transcription ribosomique (61). TTF-I est donc capable d'induire autant la condensation que la décondensation de la structure chromatinienne au niveau du promoteur. Par contre, ce qui détermine si TTF-I induira la condensation ou la décondensation de la chromatine reste encore à être élucidé.

1.5.3 ARF

Il fut récemment démontré que TTF-I interagit avec ARF (« alternate reading frame protein ») (Lessard et Ivanchuck, communications personnelles, figure 9).

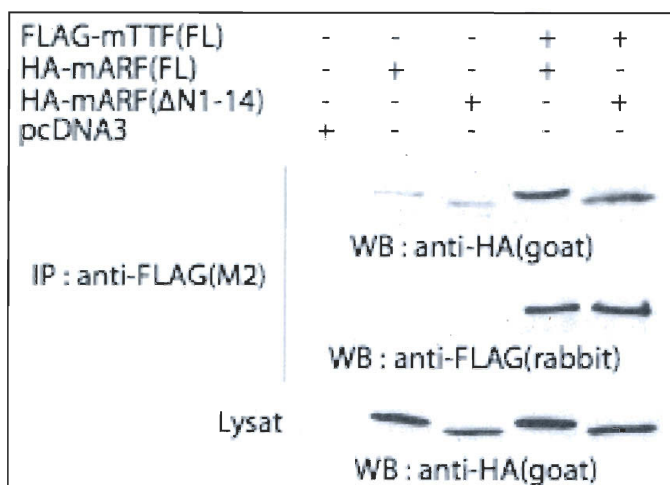


Figure 9. Co-immunoprécipitation démontrant l'interaction TTF-I/ARF. La forme pleine longueur de TTF-I interagit avec la forme pleine longueur d'ARF (puits 4) ainsi qu'avec une forme tronquée de 14 acides aminés en N-terminale (puits 5). Cette expérience fut effectuée dans des cellules 293T. Données non

publiées fournies par Frédéric Lessard.

Le gène codant pour ARF est reconnu comme étant un supresseur de tumeur dont le produit protéique module la stabilisation de p53 par une interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2 (« murine double minute ») (105). Par contre, en conditions normales, p53 est ubiquitiné par MDM2 ce qui provoque sa dégradation et sert à maintenir son niveau cellulaire très bas et évite de l'apoptose spontané (37) (figure 10). Lorsque la cellule est exposée à des stress quelconques, ARF est exprimé et inhibe la fonction de MDM2 et stabilisant p53. La stabilisation de p53 induit la mort cellulaire par apoptose (37).

Par contre, ARF est également capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire indépendamment de p53 et ceci due à sa capacité d'inhiber le processus de maturation des ARNr (93). Une surexpression d'ARF induit une inhibition quasi totale de la maturation de l'ARN 47S (93). Il est également connu qu'ARF provoque la dégradation de B23, une protéine ribosomique essentielle au clivage de l'ARN 32S pour former les ARN 28S et 5,8S, mais l'effet observé lors d'une surexpression dépasse de loin l'effet d'une diminution de B23 (4, 30) (figure 11). Il est clair que d'autres facteurs sont impliqués.

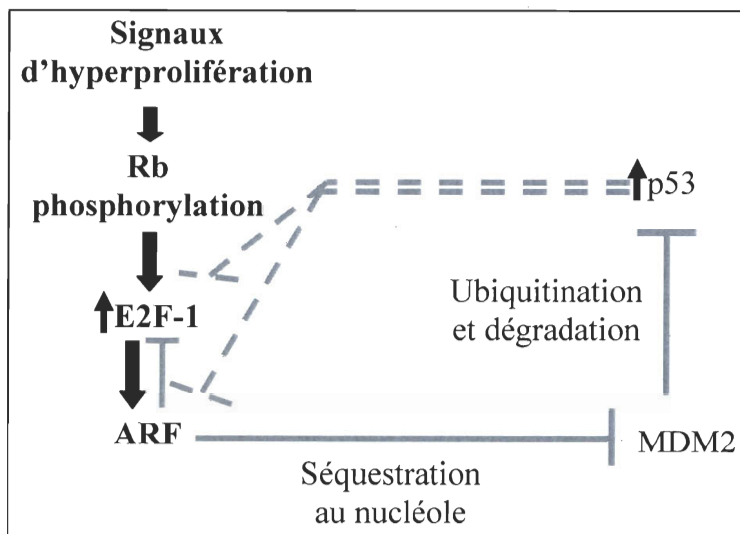
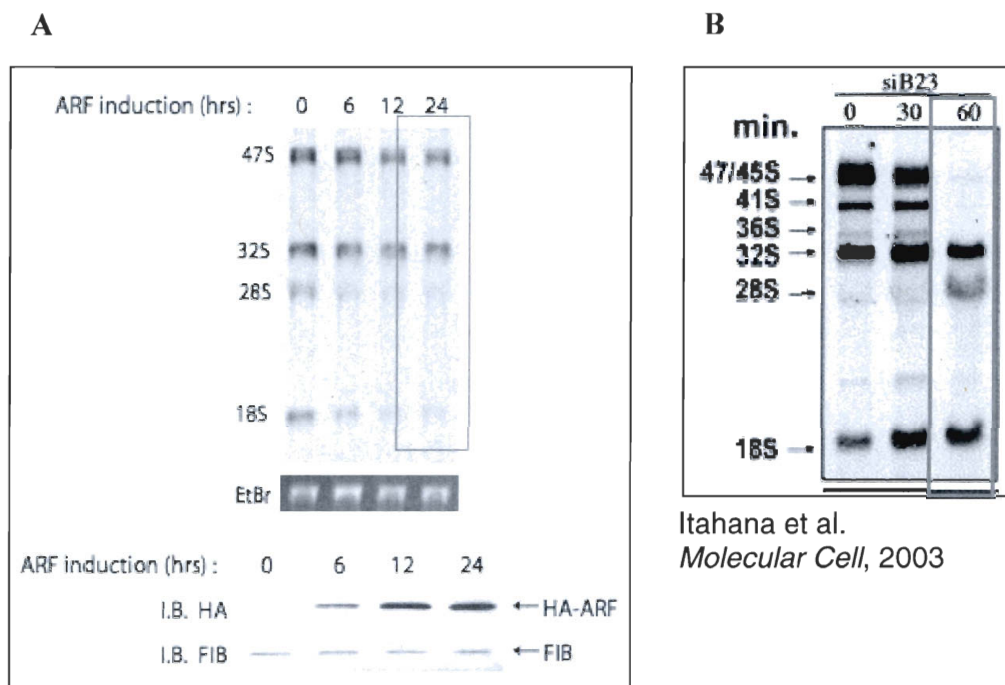


Figure 10. Boucle de régulation p53/MDM2/ARF. En séquestrant MDM2 au nucléole, ARF empêche l'ubiquitinylation et la dégradation de p53 ainsi permettant ainsi sa stabilisation.

Lors des études ciblant l'interaction entre TTF-I et ARF, il fut démontré qu'une surexpression d'ARF induit la délocalisation de TTF-I du nucléole (Frédéric Lessard, communication personnelle). Nous nous sommes donc interrogés sur la possibilité que TTF-I puisse être un lien entre ARF et son effet inhibiteur de la maturation des ARNr. L'objectif de mon projet de maîtrise était de développer un modèle de diminution de TTF-I dans des cellules murines et d'étudier les effets d'une diminution de TTF-I sur les différentes étapes de la biosynthèse ribosomique.



Frédéric Lessard, données non publiés

Figure 11. Effets de l'induction d'ARF et d'une diminution de B23 sur le processus de maturation des ARNr. A) Des marquages métaboliques de cellules NIH 3T3 de type sauvage, qui n'expriment pas d'ARF endogène, et des cellules NIH 3T3, dans lesquels on a inséré un gène codant pour ARF inducible par le zinc (MT-ARF), non traitées et traitées au zinc. Le processus de maturation des ARNr se déroule normalement dans toutes les conditions sauf celle des MT-ARF traitées au zinc où on a une surexpression d'ARF qui résulte dans une perturbation importante de la maturation des ARNr en très peu de temps (encadré rouge) (Frédéric Lessard, données non publiées). B) Induction d'une diminution de B23 par interférence à l'ARN dans des cellules U2OS démontrant une inhibition spécifique du clivage de l'ARN 32S (encadré rouge). Tiré de Itahana et collaborateurs (30).

Chapitre 2 Méthodologie

UBF

2.1.1 Lignées cellulaires ES hétérozygotes UBF loxP^{+/-}

Des cellules souches embryonnaires (ES) murines WW6 (gracieuseté du laboratoire du Dr. Jean Charron) furent cultivées dans du DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium », Invitrogen) avec Gibco pénicilline/streptomycine (1000 U/ml de pénicilline, 1000 µg/ml de streptomycine, Invitrogen) et additionné de 10% de FBS qualifié pour les cellules ES (« ES cell-qualified fetal bovin serum », Invitrogen), 0.02 M de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 100 µM d'acides aminés non-essentiels MEM (Invitrogen), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et de 0.00075 % de β-mercaptoethanol (38 µl de β-mercaptoethanol ≥98% dans un volume final de 50 ml, Sigma-Aldrich). Leur différenciation fut empêchée en les cultivant sur une couche de cellules NIH 3T3 neo résistantes sécrétant de la LIF (« leukemia inducible factor ») et préalablement traités à 10 µg/ml de mitomycine C (Sigma-Aldrich) pour une période de trois heures. Les cellules ES furent électroporées avec 25 µg du vecteur pGKneo3'del5' linéarisé avec l'enzyme XhoI (10 000 U/mL, Invitrogen). L'électroporation de 20 x 10⁶ cellules dans 500 µl de PBS (« phosphate buffered saline », 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de phosphate de sodium et 1,8 mM de phosphate de potassium) fut effectuée à l'aide de l'appareil Gene pulser II (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) (gracieuseté du laboratoire du Dr. Jean-Yves Masson). L'appareil fut ajusté pour effectuer une pulsion double à un voltage de 0,3 V, à une capacitance de 25 µF et pour une période de 0,8 secondes par pulsion. Après 24 h de récupération, les ES furent exposées à 400 µg/ml de G418 (Invitrogen). Les clones résistants furent isolés et amplifiés. Leurs géotypes furent ensuite déterminés.

2.1.2 Détermination des géotypes des lignées cellulaires hétérozygotes UBF loxP^{+/-} par Southern blot

Les géotypes furent déterminés par transfert de Southern. Les Southern furent effectués en utilisant environ 10 µg d'ADN génomique (ADNg) extrait de chacun des clones par

digestion à la protéinase K (Invitrogen) suivi d'une précipitation à l'éthanol à 95% et digéré à la EcoRI (50 000 U/ml, Invitrogen) pendant 24 h ou plus. L'ADNg fut migré sur un gel d'agarose (Invitrogen) à 0,8% pendant 16 heures dans un tampon de glycine (0,2 M de glycine (Sigma-Aldrich) et 0,015 M de NaOH (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie, USA). Suite à cette migration, le gel à subi un pontage aux rayons UV et fut traité deux fois pendant 15 minutes au HCl à 0.25 M (Fisher Scientific) et ensuite trois fois pendant 15 minutes dans un tampon de dénaturation composé de 0,5 M de NaOH et 1,5 M de NaCl (Sigma-Aldrich). L'ADN fut ensuite transféré sur une membrane de biotine B (« Biodyne B membrane », VWR International, Ville Mont-Royale, Québec, Canada) dans le tampon de dénaturation à l'aide de l'appareil « Vacublot » (90 minutes à 150 mbar, « Vaco-blot System », Montreal Biotech Inc., Kirkland, Québec, Canada). La membrane fut rincée au 2X SSC (2X « saline sodium citrate » : 30 mM de citrate de trisodium et 30 mM de NaCl) et soumis ensuite à un pontage aux rayons UV et une pré-hybridation dans un four rotatoire à 65°C dans un tampon phosphate/SDS (0,07 % de SDS (« sodium dodecyl sulfate », Sigma-Aldrich, Oaville, Ontario, Canada), 12,5 mM de phosphate de sodium pH 7.2, 0,05 mM de Na-EDTA pH 7,0 (Sigma-Aldrich)) additionné de 150 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. L'hybridation fut également effectuée à 65°C en utilisant le même tampon phosphate/SDS sans ADN de sperme de saumon mais additionné d'une sonde radioactive. La sonde radioactive fut générée en marquant environ 25 ng du fragment d'ADN en question avec du dCTP α -³²P (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Le marquage même de la sonde radioactive fut effectué à l'aide du system de marquage radioactif « Rediprime II » (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA). Après une hybridation de 16 à 18 heures, la membrane fut lavée à un tampon phosphate dénommé « lavage 1 » (20 mM de phosphate de sodium pH 7.2, 0,05 % de SDS) et, si nécessaire, lavée avec un deuxième tampon plus rigoureux (plus faible en détergents) et dénommé « lavage 2 » (20 mM de phosphate de sodium pH 7.2, 0,01 % de SDS). Une fois que 10 cps (comptes par seconde) ou moins furent comptés sur un « Series 900 Mini-Monitor » (Mini Instruments Inc, Burnham on Crouch, Essex, England) où une bande d'ADN radioactif est attendu, la membrane fut rincée au 2X SSC, enveloppé dans une pellicule de plastique et exposée à un écran de phosphore (GE Healthcare) pendant environ 16 heures. L'écran fut ensuite analysé par un appareil « Storm 860 » (GE Healthcare). La sonde couvre la région

3' d'UBF de la position 8761 à la position 9555 dans gUBFexons (annexe B) et décèle un fragment de 7.9 kb dans le contexte génomique de type sauvage et de 9.9 kb dans le contexte génomique mutant recombiné ($loxP^{+/-}$).

Une deuxième analyse par transfert de Southern fut élaborée afin de vérifier l'intégrité de la région 5' de l'insertion dans la lignée cellulaire ES hétérozygote UBF $loxP^{+/-}$. Dans le cadre de cette stratégie d'analyse par Southern, l'ADN génomique fut digéré avec XbaI (New England Biolabs) et une sonde 5' couvrant la région 495-1036 dans gUBFexons (annexe B) d'UBF génomique fut utilisée. Dans le contexte génomique de type sauvage, cette sonde décèle un fragment d'ADN d'environ 11 kb, tandis que dans le contexte mutant recombiné elle décèle un fragment d'ADN d'environ 7,5 kb.

2.1.3 Obtention de souris hétérozygotes UBF $loxP^{+/-}$ et détermination des génotypes par analyse de type PCR

Les clones ES hétérozygotes UBF $loxP^{+/-}$ furent individuellement injectées dans des blastocystes chirurgiquement extraits de souris femelles au contexte génomique ICR (« imprinting control region »). Les blastocystes furent ensuite chirurgiquement implantés dans des souris femelles pseudogestantes du même contexte génomique. Les chimères naissantes furent détectées par observation de la pigmentation du pelage et furent ensuite croisées avec des mâles de contexte génomique ICR. La transmission fut détectée par observation de la pigmentation du pelage conjoint avec une analyse par PCR. Une approche de PCR employant trois amorces fut développée à cette fin ainsi que pour détecter la recombinaison après exposition à la CRE recombinase, donc pour déterminer les génotypes des souris hétérozygotes UBF^{+/-}. Une approche standard pour l'ADN polymérase Taq telle que décrite par le fournisseur (5000 U/ml, New England BioLabs, Pickering, Ontario, Canada) fut effectuée avec environ 0,5 µg d'ADNg à une température d'hybridation de 60°C.

PCR pour détermination des génotypes des lignées cellulaires hétérozygotes UBF loxP^{+/-} et UBF^{-/+}

Étape	Température (°C)	Durée (secondes)
1	95	45
2	95	30
3	60	30
4	72	30
5	72	600
6	4	Pause

X 30

Il est à noter que l'ADNg fut extrait d'un bout de queue coupé de chacun des animaux et fut ensuite digéré à la protéinase K comme décrit dans la section 2.1.3.

Un μ l de chacun des amorces UBFgénotypeCRE(2).FOR (seq : 5' TGA GCC CTT TGT CCA TA 3'), UBFgénotypeCRE.REV (seq : 5' TCC TCA CGT TTG GCT CT 3') et UBFgénotypeCRE(3way).REVmid (seq : 5' GGG AAT CCT GTC TTG CT 3'), 1 μ l des quatre dNTP à 10 mM, 5 μ l de tampon réactif « 3+ » (300 mM de Tricine, 20 mM de MgCl₂, 50 mM de β -Mercaptoéthanol, 0,1% de gelatine, 1% de NP-40) et 1 μ l de l'ADN polymérase Taq furent utilisés dans chaque mélange réactionnel. Dix μ l de chaque mélange réactionnel fut soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans un tampon de glycine/NaOH. Dans le cas d'un contexte génomique de type sauvage un fragment de 129 pb est amplifié, dans le cas d'un contexte génomique mutant loxP un fragment de 237 pb est amplifié et dans le cas d'un contexte génomique où il y aurait eu recombinaison des sites loxP par la CRE recombinase, un fragment de 755 pb est amplifié.

2.1.4 Obtention de souris hétérozygotes UBF^{-/+} et détermination des génotypes par analyses par PCR et de type Southern

Les souris hétérozygotes loxP^{+/-} furent croisées avec des souris de contexte génomique Sox2CRE^{+/-} exprimant systématiquement et tôt dans le développement la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur Sox2. Les génotypes des souris naissantes furent déterminés

à l'aide de la méthode faisant appel à la PCR décrite ci-dessus (« PCR pour déterminer les génotypes des lignées cellulaires hétérozygotes UBF loxP^{+/-} et UBF^{-/+} ») afin de déterminer si la recombinaison de l'allèle dont la séquence correspondant à la séquence DEL (flanquée de deux sites loxP) avait eu lieu.

Dans le cas d'un génotype avec la présence de la CRE recombinase et dont l'allèle UBF loxP aurait pu avoir été désactivé par recombinaison, une deuxième PCR fut effectuée en parallèle afin de confirmer la présence de la CRE recombinase chez ces animaux. Cette PCR fut également effectuée avec l'ADN polymérase Taq avec 0,5 µg d'ADNg mais à une température d'hybridation de 54°C.

PCR pour détecter l'expression de la CRE chez les animaux UFB -/+

Étape	Température (°C)	Durée (secondes)	
1	95	30	
2	95	30	X 30
3	54	30	
4	72	30	
5	72	600	
6	4	Pause	

Un µl de chacun des amorces Cre 5' (seq : 5'-CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG-3') et Cre 3' (seq : 5'-CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC-3') 1 µl des quatre dNTP à 10 mM, 5 µl de tampon réactif « 3+ » et 1 µl de l'ADN polymérase Taq furent utilisés dans chaque mélange réactionnel. Dix µl de chaque réaction fut migré sur gel, semblablement à la méthode PCR décrite ci-dessus (PCR pour déterminer les génotypes des lignées cellulaires UBF loxP^{+/-} et UBF^{-/+}).

La détermination des génotypes par analyse de type Southern fut également effectuée avec les portées résultant d'un croisement entre un animal UBF loxP^{+/-} et un animal Sox2CRE^{-/+}. L'approche de Southern utilisée faisait appel à la méthode décrite ci-dessus dans la section 2.1.3 (Southern employant la sonde 3' et la digestion EcorRI). Dans le cas de la présence de l'allèle Sox2CRE et de la recombinaison des sites loxP de l'allèle UBF loxP (génotype

UBF^{+/-} Sox2CRE^{+/-}), le fragment d'ADN décelé à l'aide de la sonde dénommée 3' était d'une grosseur d'environ 6,5 kb.

2.2 TTF-I

2.2.1 Vecteur inductible MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I

Le shRNAmir (Open Biosystems, Huntsville, Alabama, USA) ciblant TTF-I (numéro d'accèsion : NM_009442) chez la souris a été extrait du plasmide de réception (pSM2) par la méthode basée sur la PCR telle que décrite par le fournisseur (Open Biosystems). Une PCR standard décrite par le fournisseur pour l'usage de l'ADN polymérase Pfu Ultra (VWR International) fut effectuée à une température d'hybridation de 58°C.

PCR pour amplification du shRNAmir TTF-I

Étape	Température (°C)	Durée (secondes)	
1	95	30	
2	95	15	X 30
3	58	30	
4	72	25	
5	72	600	
6	4	Pause	

Un µl de chacun des amorces pSM2.FOR (seq : 5' AAG CCC TTT GTA CAC CCT AAG CCT 3') et pSM2.REV (seq : 5' ACT GGT GAA ACT CAC CCA GGG ATT 3') conçus à cette fin par Open Biosystems, 1 µl des quatre dNTP à 10 mM, 5 µl de tampon réactif 3+ et 1 µl de Phusion polymérase furent utilisés dans chaque mélange réactionnel. Le fragment obtenu (1,417 kb) fut purifié par une extraction au phénol/chloroforme et digéré à la EcoRI et à la XhoI pour donner le shRNAmir à environ 110 pb. Le shRNAmir fut isolé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % dans un tampon de glycine/NaOH à l'aide du « Qiaex II gel purification kit » (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) et cloné entre les sites XhoI (position 2161) et EcoRI (position 2173) du vecteur MSCV-TMP (« Tetracycline-regulated retroviral vector- SIN-TREmiR30-PIG» (annexe C), Open

Biosystems) préalablement déphosphorylé à l'aide de la SAP. La ligation du fragment au vecteur fut effectuée à l'aide de l'ADN ligase de T4 selon la méthode décrite par le fournisseur (Invitrogen). Le vecteur TMP est de nature rétroviral auto-inactivant (SIN : «self-inactivating») et exprime le shRNAmir d'un promoteur TRE-CMV (TRE : «Tetracycline-repressed element», CMV : Cytomégalo virus) sous contrôle de la tetracycline (ou la doxycycline). En absence de tetracycline et doxycycline la transcription du shRNAmir ciblant TTF-I inséré dans le vecteur MSCV-TMP est activée tandis qu'en présence de tetracycline/doxycycline, l'expression est supprimée. Ce vecteur contient également une cassette de résistance à la puromycine (~2790-3415) et une cassette codant pour la protéine fluorescente GFP («Green fluorescent protein», ~4069-4798) qui est exprimé de façon constitutive et qui sert de marqueur pour confirmer l'insertion du vecteur dans le génome cellulaire.

2.2.2 Obtention de lignées cellulaires MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I (clone A10) et MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I + Flag-TTF-I (clone A10 TTF-I)

Des cellules NIH 3T3 furent transfectées avec le vecteur inductible MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I selon le protocole suggéré par le fournisseur pour l'utilisation de l'agent de transfection ExGen500 (Fermentas). Les cellules furent incubées pendant 16 à 18 heures dans un milieu de culture DMEM/FBS (DMEM additionnée de Gibco antibiotique/antimycotique (Invitrogen), 10% de FBS et 0,02 M de pyruvate de sodium) en absence d'agent de sélection mais additionné de 1,5 µg/ml de doxycycline (Invitrogen) afin d'éviter l'expression du shRNAmir ciblant TTF-I pendant la période de sélection. Suite à cette incubation, les cellules furent maintenues sous sélection dans un milieu de culture additionné de 2 µg/ml de puromycine (Invitrogen) En plus de l'agent de sélection, le milieu de culture était également additionné de 1,5 µg/ml de doxycycline (Invitrogen) pour supprimer l'expression du shRNAmir ciblant TTF-I. Après deux semaines de sélection à la puromycine (µg/ml), les clones furent isolés et amplifiés. Lorsque les clones atteignirent environ 60 % de confluence dans des pétris de 60 mm (Sarstedt, Montréal, Québec,

Canada), la concentration de la puromycine fut augmentée à 8 µg/ml pour promouvoir la stabilité du vecteur MSCV-TMP/shRNAmir-TTF-I dans le génome des cellules.

Après avoir obtenu un clone ayant intégré de façon stable dans son génome le vecteur exprimant de façon inductible le shRNAmir ciblant TTF-I (clone A10), ce clone fut utilisé pour obtenir un modèle cellulaire de récupération. Un vecteur additionnel fut transfecté de façon stable dans le clone A10. Préalablement fabriqué dans le laboratoire Moss, ce vecteur (pRevTRE-FlagTTF-I) exprime une forme pleine longueur de TTF-I portant une séquence « flag » en N-terminal et ceci sous le control d'un promoteur répondant à la doxycycline. Le vecteur pRevTRE-FlagTTF-I porte également une cassette conférant la résistance à l'hygromycine ce qui permet de faire une double sélection pour l'insertion de ce vecteur et du vecteur TMP/shRNAmir-TTF-I simultanément en employant du milieu de culture additionné des antibiotiques puromycine et hygromycine. La transfection du vecteur pRevTRE-FlagTTF-I fut effectuée chez une population de cellules du clone A10 dans une boîte de pétri de 100 mm selon le protocole du fournisseur de l'agent de transfection ExGen500 (Fermentas). Les cellules furent ensuite incubées pendant 16 à 18 heures dans un milieu de culture DMEM/FBS sans agent de sélection mais additionné de 1,5 µg/ml de doxycycline afin d'éviter l'expression précoce du shRNAmir ciblant TTF-I et de la forme pleine longueur de TTF-I. Les agents de sélection hygromycine à 100 µg/ml et puromycine à 2 µg/ml furent ajoutés après cette période d'incubation et l'incubation fut poursuivie pour plus de deux semaines. Les clones survivant furent combinés pour former une population hétérogène désigné A10 TTF-I. Lorsque les cellules atteignirent environ 60 % de confluence dans des pétris de 100 mm, la concentration de la puromycine fut augmentée à 8 µg/ml pour promouvoir la stabilité du vecteur TMP/shRNAmir-TTF-I dans le génome. Cette sélection (8 µg/ml puromycine + 100 µg/ml hygromycine + 1,5 µg/ml de doxycycline) fut constamment maintenue durant la culture du clone A10 TTF-I. Pendant les expérimentations, la doxycycline était omise afin d'induire l'expression du shRNAmir ciblant TTF-I et de flag-TTF-I simultanément.

2.2.3 Induction du shRNAmir ciblant TTF-I chez le clone A10 et le clone A10 TTF-I et analyse de type Western

Afin de déterminer s'il était possible d'induire une diminution de TTF-I chez les clones amplifiés, des duplicata d'induction du shRNAmir d'une période de 0, 1, 2 et 3 jours ont été effectués en enlevant la doxycycline/tetracycline du milieu de culture des cellules contenues dans des boîtes de pétri de 60 mm. Pour ce faire, du DMEM « tetracycline-free » (Invitrogen) additionnée de 10 % de FBS et de Gibco antibiotique-antimycotique (Invitrogen) fut utilisé. Les protéines des cellules entières furent extraites en grattant les cellules dans 1 ml de PBS et en centrifugeant pendant 30 secondes à 14 000 rpm (température de la pièce). Le culot fut repris dans environ 300 µl d'eau « double distilled » (ddH₂O) et congelé en submergeant dans l'azote liquide. Immédiatement avant d'effectuer le chargement des protéines sur un gel d'acrylamide, environ 15 µl de chaque extrait, additionné de 3 µl de tampon SDS (« 6X SDS loading buffer » : 30 % de glycérol (Sigma-Aldrich), 15 % de β-mercaptoethanol, 10% de SDS et 37,5 % du tampon de polymérisation « 4X upper Tris » (0,5 M de Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 0,4 % de SDS)) fut chauffé à 95°C pendant 10 minutes. Les protéines dénaturés furent ensuite soumises à une électrophorèse sur un gel d'acrylamide (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à 8 % dans un tampon SDS (50 mM de Tris base, 20 mM de glycine, 3,5 mM de SDS) et transféré sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (GE Healthcare) dans un tampon de transfert à 4°C (25 mM de Tris base, 192 mM de glycine, 20 % de méthanol (Fisher Scientific)) à l'aide d'un appareil de transfert Hoefer TE22 (GE Healthcare). La membrane fut ensuite lavée au TBS (« Tris base saline » : 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 7.4) et incubée avec 5 % de lait en poudre dans du TBS pendant 90 minutes avant d'être incubée pendant environ 16 heures dans une solution de 1 % de lait en poudre dans du TBS additionnée de l'anticorps polyclonal de lapin anti TTF-I M3 précédemment développé dans le laboratoire Moss (dilution 1/500) (Frédéric Lessard). Des lavages au TBS-T (TBS additionné de 0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich)) furent effectués suivi d'une deuxième incubation au lait en poudre à 5 % et d'une incubation d'une heure dans du lait en poudre à 1 % dans du TBS additionné d'un anticorps secondaire anti IgG de lapin (« Rabbit IgG, HRP-linked, from donkey », dilution 1/8000, GE Healthcare). La membrane fut ensuite

lavée au TBS-T, traité au ECL (« Enhanced chemiluminescence Plus Western blotting detection reagents », GE Healthcare), exposée sur un film autoradiographique (« Hyblot CL Autoradiography Film », Denville, South Plainfield, New Jersey, USA) et développée. En guise de control de chargement de protéines sur le gel d'acrylamide, une incubation fut effectuée en parallèle à l'aide d'un anticorps primaire de souris anti fibrillarine (« Mouse anti-fibrillarmon monoclonal antibody », dilution 1/500, Bio Can Scientific Inc., Mississauga, Ontario, Canada) et un anticorps secondaire anti IgG de souris (« C23 (MS) mouse monoclonal IgG », dilution 1/5000, Santa Cruz Biotechnologies, Inc, Santa Cruz, California, USA).

2.2.4 Marquages métaboliques des clones A10 et A10 TTF-I

Afin de déterminer si une diminution de TTF-I a des effets sur la transcription ribosomique ou le processus de la maturation des ARNr, nous avons effectué des marquages métaboliques à l'uridine tritié (^3H -uridine, GE Healthcare) chez les deux modèles cellulaires : le clone A10, pour lequel la diminution de TTF-I avait été mise en évidence, et le clone A10 TTF-I, qui démontrait la capacité d'induire le shRNAmir ciblant TTF-I tout en surexprimant TTF-I. Pour chacun des clones, des triplicata de traitements d'induction de 0, 1, 2 et 3 jours ont été effectués dans des pétri de 60 mm et ceci fut suivi d'une incubation d'une durée de 3 heures à 37°C dans 2 ml de milieu de culture DMEM (sans antibiotique) additionné de 5 $\mu\text{Ci/ml}$ d'uridine tritié. Le milieu de culture fut ensuite enlevé et 1 ml de Trizol (Sigma-Aldrich) fut utilisé pour lyser les cellules et recueillir les extraits dans une Eppendorff de 2 ml (Sarstedt). Deux cent μl de chloroforme/alcool isoamyl 24 :1 (Fisher Scientific) fut ajouté à chaque échantillon et chacun fut mélangé, incubé pendant 2 à 3 minutes à la température de la pièce et ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant fut recueilli, transféré à un nouvel tube de 1.5 ml (Sarstedt) et additionné de 500 μl d'isopropanol (Fisher Scientific). Ce mélange fut incubé à la température de la pièce pendant 15 minutes pour ensuite être centrifugé pendant 10 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant fut décanté et le liquide résiduel enlevé à l'aide d'une pipette. Le culot fut repris dans 1 ml d'éthanol à 75 % et centrifugé encore pendant 5 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant fut encore décanté, le liquide résiduel enlevé par pipetage et 40 μl de formamide (« Formamide Ultra-pure, Fisher Scientific, Pittsburgh,

Pennsylvanie, USA) fut utilisé pour reprendre le culot d'ARN (incubation endant 20 minutes à la température de la pièce en mélangeant à l'aide d'un appareil Vortex à chaque 5 minutes). Environ 2 µg d'ARN de chaque échantillon fut soumis à une électrophorèse sur un gel composé de 1 % d'agarose dissout dans 97 ml de tampon MOPS 1X (Fisher Scientific) additionné de 23 ml de formaldéhyde (« Paraformaldéhyde », Fisher Scientific) pendant 16 heures à environ 30 V. Le gel subit une exposition de 4 fois 5 minutes aux rayons UV afin de fragmenter l'ARN pour faciliter le transfert sur une membrane. L'ARN fut ensuite transféré sur une membrane de Biodyne B dans un tampon de 2X SSC à l'aide de l'appareil Vacublot (90 minutes à 150 mbar). La membrane subit un pontage aux rayons UV et fut séchée, traitée au EN³HANCE (« Spray surface autoradiography enhancer », Perkin-Elmer) et encore séchée, le tout sous une hotte chimique. Une autofluorographie fut ensuite exécutée en exposant la membrane traitée au EN³HANCE directement à un film autoradiographique XAR-5 (GE Healthcare) entre deux papiers Whatman 3 mm (Rose Scientific, Calgary, Alberta, Canada).

Afin de quantifier les résultats du marquage, les niveaux de ³H sur la membrane ont été comptés. Ceci fut effectué en superposant avec le film autoradiographique développé la membrane de l'expérience sur un transilluminateur, en encadrant sur la membrane les régions correspondant aux ARNr 47S, 32S, 28S et 5,8S, en les découpant et en les déposant dans des fioles de scintillation. Dix ml de liquide de scintillation (Fisher Scientific) fut ensuite ajouté à chaque échantillon et ceux-ci furent comptés premièrement avec la face du fragment de membrane par en haut et une deuxième fois avec la face du fragment de membrane par en bas. Les moyennes des deux comptages furent utilisées comme données brutes et transformées en graphique à l'aide du logiciel Excel.

2.2.5 Analyses FACS des clones A10, B10 et A10 TTF-I

Après des traitements d'induction de 0, 1 et 2 jours en triplicata, les cellules du clone A10 furent lavées deux fois au PBS, traitées à la trypsine et comptées. Un million de cellules furent centrifugées et repris dans 500 µl de PBS à 4°C. Cinq cent µl d'éthanol à 100 % à 20°C fut ajouté lentement à la suspension pour fixer les cellules. Les cellules fixées pouvaient être gardées à 4°C pendant une période de 3 mois maximum en attendant le

moment d'effectuer l'analyse par FACS (fluorescence-assisted cell sorting). Par contre, il était préférable d'effectuer la fixation le même jour que l'analyse. Précédant l'analyse par FACS, une coloration des cellules devait être effectuée. Pour ce faire, la suspension de cellules fixées fut centrifugée et les cellules reprises dans 1 ml d'une solution d'iodure de propidium à 1 M.

L'analyse par FACS consistait en une analyse de ploïdie, donc elle servait à déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire se trouvaient les cellules au moment de la fixation. Un appareil « EPICS Elite » (Beckman Coulter Canada, Inc, Mississauga, Ontario, Canada) fut employé pour effectuer l'analyse. Les données brutes furent recueillies par le logiciel Expo II, traités par le logiciel Multicycle et transformés en graphiques à l'aide du logiciel Excel.

Chapitre 3 Résultats

3.1 UBF

3.1.1 Vecteur de désactivation génique conditionnel pGKneo3'del5'

Des fragments de la séquence génomique d'UBF (numéro d'accension : NM_011551) furent extraites d'un vecteur pBSKS contenant les premiers 6 kb en 5' de la séquence génomique d'UBF de souris préalablement cloné dans le laboratoire. Ces fragments furent insérés dans le vecteur pGKneoF2L2dta (gracieuseté du laboratoire du Dr. Jean Charron). Ce vecteur contient deux sites loxP (position 707-740 et 2564-2597 par rapport à la position 0 conventionnelle, annexe A) pouvant être ciblés par la CRE recombinase qui induit leur recombinaison et l'excision de la région flanquée de ceux-ci. Ce vecteur contient également une cassette neo (position 776-2622), conférant la résistance à la neomycine, qui peut se faire exciser spécifiquement par la recombinaison de deux sites FRT (« flipase recognition target ») flanquants lorsque exposé à l'activité de la FLP (« flipase recombination enzyme ») ou encore par la recombinaison des deux sites loxP. Finalement, une cassette DTA (« diphtheria toxin A chain gene ») (position 2664-4244) en 3' de la cassette neo assure la sélection négative de clones qui auront subi une recombinaison non homologue en 3' du vecteur pGKneoF2L2dta. Une région critique de la séquence génomique d'UBF (DEL, section 2683-4070 selon cette séquence génomique d'UBF : gUBFexons (annexe B)), incluant les exons 3 à 6, fut insérée dans un site SmaI (position 775) (10 000 U/ml, New England BioLabs, Pickering, Ontario, Canada) situé entre les deux sites loxP du vecteur pGKneoF2L2dta et directement en 5' de la cassette neo. Les deux sites loxP permettront l'excision de la cassette neo et de la région DEL et induiront l'inactivation du gène codant pour UBF lorsqu'il y aura présence de la CRE recombinase (figure 12). Deux séquences génomiques, 5' (section 676-2568 dans gUBFexons) et 3' (section 4176-6696 dans gUBFexons) de la région DEL incluant les exons 1 à 2 et 7 à 8 respectivement, furent insérées de façon à permettre l'insertion de la région DEL flanquée par des sites loxP dans le génome des cellules souches embryonnaires de souris par recombinaison homologue. La région 5' fut insérée entre les sites SacII (position 664) (10 000 U/ml, New England Biolabs) et NotI (position 670) (10 000 U/ml, New England BioLabs, Pickering, Ontario, Canada) directement en 5' de la séquence loxP en amont du

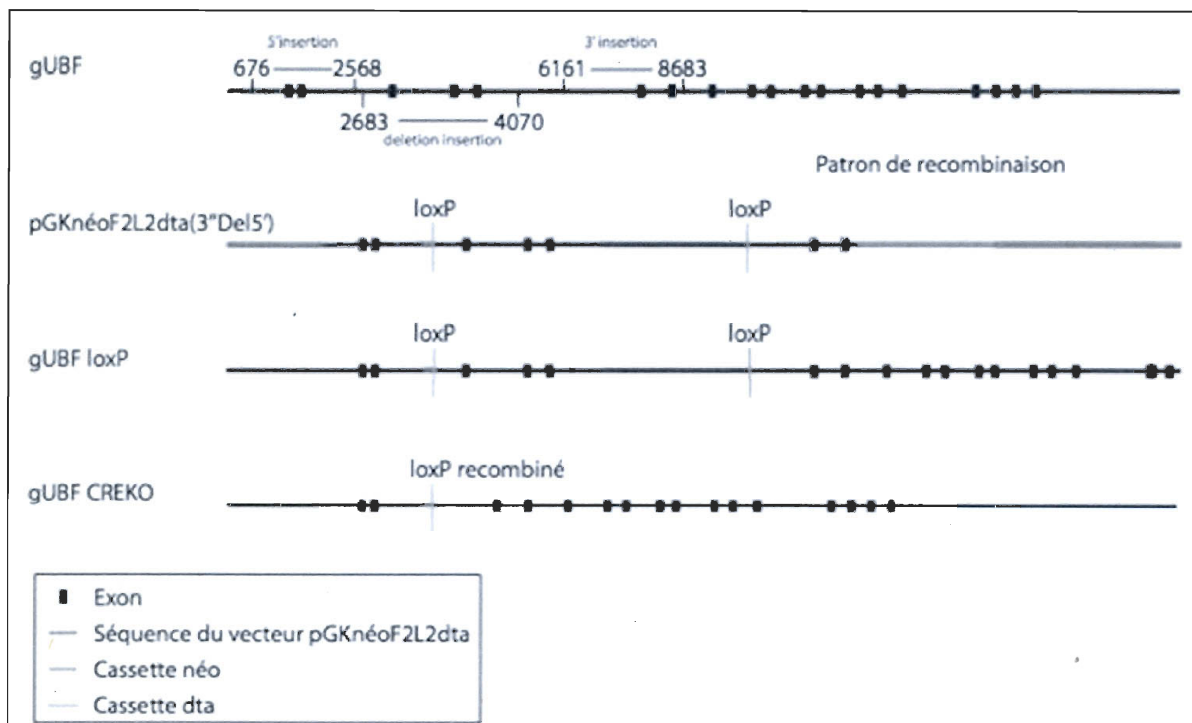


Figure 12. Vecteur pGKneoF2L2dta(3'Del5'), recombinaison génomique et désactivation du gène. Insertion des séquences génomiques d'UBF dans le vecteur pGKneoF2L2dta, recombinaison attendue pour l'intégration dans le génome (gUBF loxP) et recombinaison attendue des sites loxP lors de l'exposition à la CRE (gUBF CREKO).

site d'insertion de la région DEL. La région 3' fut insérée dans le site EcoRV (position 2645 du vecteur pGKneoF2L2dta) (20 000 U/ml, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) directement en 3' du site loxP flquant le côté 3' de la cassette neo du vecteur pGKneoF2L2dta. Une fois la construction du vecteur terminée, l'intégrité de trois insertions d'UBF génomique, des jonctions de chaque insertion et des sites loxP du vecteur final (dénomé pGKneo3'del5') fut confirmé par séquençage (Plateforme de séquençage, CHUL, Québec, Canada). La disposition des trois régions d'UBF génomique (5', DEL et 3' respectivement) assurait que le gène produise une protéine fonctionnelle après l'insertion par recombinaison des régions 5' et 3' avec les séquences génomiques complémentaires et que le gène code pour une protéine tronquée non fonctionnelle une fois l'expression de la CRE recombinase et l'excision de la région DEL/cassette neo effectué (figure 13).

A

atgaaagggggccacaagcaaatttaagaccacactgaaactttgtacaagaaaaagaatggcttctgtgtctgaaaaaa
 ▶ M K G G T S K F K T H T E T L Y K K K K W S S V S E K
 gacctcagaatgtccctctcagtgcttggagagcaagcagcctcaggtatctgtgttggggagaggaggaggcgtccca
 ▶ R P Q K C P S Q C L E S K Q P Q V S V L G K R R R A S Q
 gacaccagcccaggagaccttagagagtgagtgccctcaaaaggccaagaggaagaaggaggagggaaccccagacacca
 ▶ T P A Q E T L E S E W P Q K A K R K K R R R E P Q T P
 gccaggagaccttagagagtgagtgccctcaaaaggccaaggaagaagaaggaggagggaaccccagacaccaacccaag
 ▶ A Q E T L E S E W P Q K A K K K K R R R G E P Q T P T Q
 agagtttggagagtgagcagcctccagtgcttctgtgggaagagaaggagggaatcccagacaccagcccaggagaactc
 ▶ E S L E S E Q P P V S L L G K R R R E S Q T P A Q E N S
 ggagagtgagcagcctcggaaagccaagagaaggaggaagaaaggaagggtcccagcaaccaacttctcctccttctgaaa
 ▶ E S E Q P R K A K R R R K K R K G S Q Q P T S S L L K
 actccagaacacttcttaagctaaagaaaaccacttctgccacaagaagaaaagaatagtgttctggaggtggatattgg
 ▶ T P E T F L K A K K T T S A H K K K K N S V L E V D M
 aaactgggatcatcctttagatagaagaaaacatggagaacctgctagagacttctogaaggatgtggatattgtttatgt
 ▶ E T G I I L V D K E N M E N L L E T S R K D V D I V Y V
 tgotatgagcaagggacaaaggtcagcaaaagtgcgtgaaacaggagagctgcccgcgtgtaagccacaggaacatggctgt
 ▶ D M S K G Q R S A K V R E T G E L P A A K P Q E H G C
 cgagagctgctcggtagcgtcaggagcagaagaaocaaaagcacctccagaagttgcaccctgggatgtttcaggggga
 ▶ R E L L G D V R S R K K Q K H L Q K V A P W D V V Q G
 gccagcctggagatattcctcctgccccatcagagccttcttctgagatttagaaggcaaaagcacagaagcagcaggt
 ▶ S Q P E S I S L P P S E P L S S E D L E G K S T E A A V
 gtttgtaaaaagagcttaaaaaaacgtgttcaggagccaggaattggagcccatcccagcagctttagtgcactcggag
 ▶ F C K K K S K K N V F R S Q E L E P I P D S L D D S E
 accatctctgagagacttagtagcacacaccatggaggagctgtcggggctggagaagaatgtgagagcaccacaagaatccc
 ▶ T I S E R L D S T H H G G A V G A G E E C E S T K E S
 acagtatcaaaaaaagtcacaagaaaagaagcacaagctctgttgccttgcacatctagtgacagtgccctcagtgacaga
 ▶ H S I K K K S K K K K H K S V A L A T S S D S A S V T D
 cagcaaggctaagaatgccctggtagctcctcagaaggcagtggtgctgtgagggaaaggagcgtggaccacagggcagca
 ▶ S K A K N A L V D S S E G S G A V R E E D V D H R P A
 gaggcagaagcccaggctgttccactgagaagcacagggagccatgcagaggttagaacctaccatgaagaagaagaagca
 ▶ E A E A Q A C S T E K H R E A M Q R L E P T H E E E S
 attcggaaatcagctagcaattctcagcaagacacatattcaggagcaggagagagctctgatgactcggatgttggatggg
 ▶ N S E S A S N S A A R H I S E D R R E S D D S D L G
 ctctgcagtgagacagctgcgagagttcattcctgacatacaggaagggcgccaccaccatcagacgcagtgatcgggat
 ▶ S A V R Q L R E F I P D I Q E R A A T T I R R M Y R D
 gacctagggcgttcaagaatttaaggcacaaggtgtggctattagatttggcaaatcttctgctaaagaaataaacaaa
 ▶ D L G R F K E F K A Q G V A I R F G K F S A K E N K Q
 tagaaaaaaatgtgcaagatttctatcctgactggaattgagagtgacagcaagctgctgtacacagacagatcccaga
 ▶ I E K N V Q D F L S L T G I E S A D K L L Y T D R Y P E
 ggaaaaagactctgatcaccacacataaaacgggaagcagcttccagactgcacattgggaagggcagctcggccctggag
 ▶ E K T L I T N L K R K H A F R L H I G K G I A R P W K
 ctctgtactaccgtgcaagaagatctttagtgatgaaataactacaagggcaggtacaatgaagaagatactaaagagctga
 ▶ L V Y Y R A K K I F D V N N Y K G R Y N E E D T K K L
 aggcataccattcctccatggaaacgactggaaaaagattggggccatggggccggaagcagcctctcagtcgcccctcaa
 ▶ K A Y H S L H G N D W K K I G A M V A R S S L S V A L K
 gttctctcagattgggtgtagtagaaaacaaaggtgcttggagtaaggcagaacccagaggctaataaggctgtggaggac
 ▶ F S Q I G G T R N Q G A W S K A E T Q R L I K A V E D
 gtgatcctaaagaagatgctccccaggagtaagagaactggattctaaactccaggaagacccctgggggtcgcctgtcaa
 ▶ V I L K M S P Q L R E L D S K L Q E D R L S
 ttgtccgggaaaaactctacaagggcatatcttgggtggaggtggaagctagagtgaggagaccggaaactggatgcagtgcaa
 ▶ I V R E K L Y K G I S W V E V E A R V E T R N W M Q C K
 aagtaagtgagacagagattcttaccaaaaggatgacccatgggtgggttctgtatctggtgggtcaatgctctacaggccaaa
 ▶ S K W T E I L T K R M T H G G F V Y R G V N A L Q A K
 atcacccttattgaagggtttagtaactaaatgtgaatgtagcttaaatgaatagactgggaagatctttagcagccatag
 ▶ I T L Y E L N V N D A N E I D W E D L A S A I
 gggatgtccctccacttttggtcaggcaaaatttataagctgaaagctgcctgcgttcccttttggcagaaaaagacttt
 ▶ G D V P P P F V Q A K F Y K L K A A C V P F W Q K K T F

```

tccagaaatcattgactacttatataagaacagtctgcctttgctgoaggaaaagttagacaagaaaatgaagaaaaaagac
▶ P E I I D Y L Y K N S L P L L K E K L D K K M K K K D
ggccagatccaacaacacctgcagctccaacaagactttctgttcaagacatcttccattgcgatgatgacagtgatgaag
▶ G Q I Q T P A A P K Q D F L F K D I F H C D D D S D E
ggagcccagaggagcccagcgcctctgatgtgcagtg
▶ G S P E E P S A S D V Q

```

B

```

AGTGTGGACCTATGCCCCCTCCCATGTGTGAGGGGGTGGGATAGAAAGCCCCCCTCCTCTCAGCCTCCTTA
AGTGGGTTTGGTGTCTCTTCAAAA GGGTGGGGT GCTTTGACCC CGGGTGGCCC GGCCAGCGC
ACCGAGGAGG TGGCTGGACA GCTGGAGAAT GAACGGAGAA GCGGACTGTC CCACAGACCT
▶ M N G E A D C P T D L
junction marker
GGAAATGGCC GCCCCCAAAG GCCAATGAAA TATATTCAGG ACTTCCAGAG GGAGAAACAG
▶ E M A A P K G Q
junction marker
GAGTTCGAGC GAAACCTGGC CCGATTGAGG GAGGATCACC CTGACCTTAT CCAGAATGCC
AAGAAGTCGG ACATCCCCGA GAAACCCAAA ACTCCCCAGC AACTGTGGTA CACCCACGAG
AAGAAGGTGT ATCTCAAAGT GCGGCCGGAT GTGAGTGTCT GGCCAAAGGG TAGGGGCGGA
GGGCACACGG CGGTGGCAAG GGGGGAGCCG CGCCTGG

```

Figure 13 : Protéines produites avant et après la recombinaison des sites loxP par la CRE recombinase. A, avant la recombinaison. B, après la recombinaison.

Toutes les ligations furent effectuées à l'aide de la T4 DNA ligase (New England Biolabs) selon le protocole suggéré par le fournisseur et les vecteurs furent déphosphorylés préalablement aux ligations à l'aide de la SAP (1000 U/ml, « Shrimp alkaline phosphatase », Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Toutes les transformations ont été effectués en utilisant les bactéries compétentes JM109 préparées dans le laboratoire préalablement.

3.1.2 Détermination des génotypes des lignées cellulaires ES hétérozygotes

UBF loxP^{+/-} par analyse de type Southern

La détermination des génotypes des clones démontrant une résistance au G418 en culture par analyse de type Southern avec la sonde 3' dévoila 17 clones positifs (figure 14).

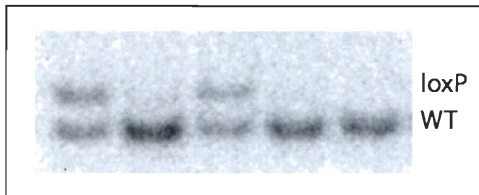


Figure 14. Exemple de clones cellulaires positifs dévoilés par analyse de type Southern du bout 3' de l'insertion. WT = type sauvage. (Southern fait par Michel Tremblay)

Un deuxième analyse de type Southern, analysant le bout 5' du gène UBF des clones qu'on supposait avaient subi une recombinaison, fut effectué avec l'ADNg des clones positifs de l'analyse du bout 3' montrée ci-dessus. Quatre clones furent positifs, soit A5, A7, C1 et C4 (figure 15). Par contre, le clone C4 montrait une bande plus forte pour le type sauvage que la bande pour le type mutant recombiné ce qui indique une contamination du clone avec des cellules de type sauvage. Le clone C4 fut donc omis de notre liste de clones positifs.

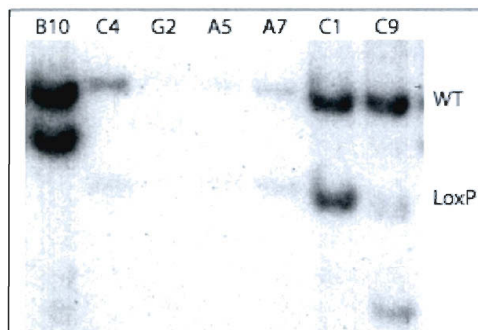


Figure 15. Analyse de type Southern de l'extrémité 5' de l'insertion dans des clones cellulaires UBF $loxP^{+/-}$. (Southern fait par Michel Tremblay)

3.1.3 Détermination des génotypes des chimères, des hétérozygotes UBF $loxP^{+/-}$ et des hétérozygotes UBF $^{-/+}$ par analyse par PCR ou analyse de type Southern

Pour la première ronde d'injections, effectuées dans le Centre de Recherche en Cancérologie (CRHDQ), une seule femelle hétérozygote fut obtenue à partir du clone UBF loxP^{+/-} A5 et celle-ci fut croisée avec des mâles de contexte génomique C57BL/6 pour générer une lignée de souris hétérozygotes UBF loxP^{+/-} (figure 16).

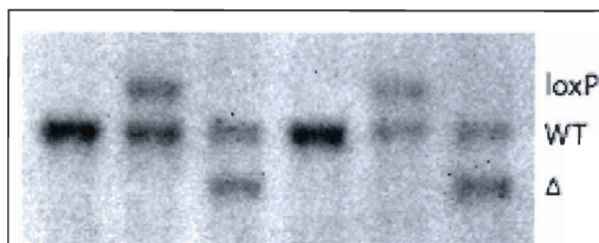


Figure 16. Détermination des génotypes par analyse de type Southern d'une portée de souris après croisement d'une femelle UBF loxP^{+/-} avec un mâle Sox2CRE^{+/-}. WT = type sauvage. (Southern fait par

Michel Tremblay)

Par la suite, les hétérozygotes furent croisés avec des souris de contexte génomique Sox2CRE^{+/-} ce qui induit la recombinaison de l'allèle UBF loxP chez les hétérozygotes (figure 17). Après des analyses préliminaires, nous avons déduit que les souris hétérozygotes UBF^{-/+} avaient un développement normal ainsi qu'un comportement individuel et social normal. Aucune aberration développementale ou psychologique ne fut observé.

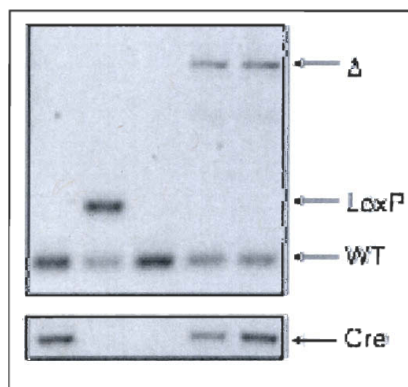


Figure 17. Détermination des génotypes par PCR d'une portée de souris après croisement d'une femelle UBF loxP^{+/-} avec un mâle Sox2CRE^{+/-}. WT = type sauvage. (PCR faite par Michel Tremblay)

Lors d'une seconde ronde d'injections effectuée par le service transgénique de l'Université McGill, la transmission fut obtenue pour les clones ES hétérozygotes UBF loxP^{+/+} A5 et C1.

3.2 TTF-I

3.2.1 Analyse de type Western et marquage métabolique du clone A10

Les analyses de type Western effectuées sur les clones résistants à la puromycine et dont l'expression du shRNAmir ciblant TTF-I avait été induit pendant des périodes de 0, 1, 2, 3 jours ont dévoilé un clone chez lequel une diminution efficace de TTF-I était possible. Après une induction d'une journée, le clone A10 subissait une élimination quasi complète de TTF-I. De son côté, le clone B10, un clone négatif utilisé comme control pour l'agent de sélection puromycine, ne démontrait aucune diminution de TTF-I même après 3 jours d'induction (figure 18).

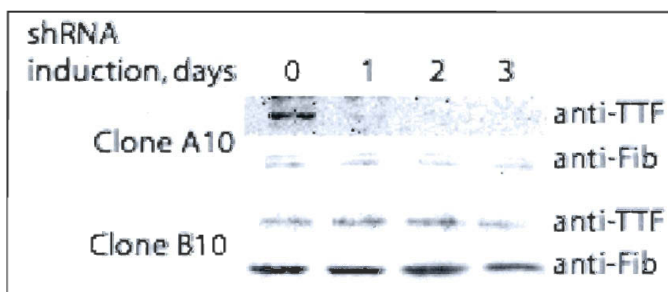


Figure 18. Analyse de type Western des protéines des clones A10 et B10 après des traitements d'induction de 0, 1, 2 et 3 jours du shRNAmir ciblant TTF-I. Élimination quasi totale de TTF-I après 1 jour d'induction chez le clone A10. Le control négatif, B10, ne subit pas de diminution de TTF-I après 3 jours d'induction.

Les marquages métaboliques du clone A10 démontrèrent une perturbation appréciable du processus de maturation des ARNr. On observe une suppression du clivage du précurseur

47S ce qui est confirmé par l'accumulation de ce dernier ainsi qu'une inhibition marquée de formation de l'ARN 18S. On observe aussi l'inhibition du clivage secondaire du précurseur 32S, également confirmé par son accumulation, ainsi que par une formation affaibli de l'ARN 28S. Aussi, une augmentation visible du coefficient de sédimentation du précurseur 32S indique que certaines étapes de digestions exonucléasiques menant à la formation de l'ARN 32S sont inhibées (figure 19).

La transcription ribosomique semble également affectée, quoiqu'il soit plus difficile de l'observer. Par contre, on ne peut nier l'effet sur la transcription ribosomique lorsqu'on voit une perturbation marquée de la maturation des ARNr après un traitement de 48 heures d'induction de la diminution de TTF-I et aucune accumulation du précurseur 47S (figure 19, comparaison 47S entre les puits des traitements d'induction de 1 jour et 2 jours d'induction). Si la transcription ribosomique n'était pas touchée, on verrait une accumulation imposante du précurseur 47S, ce qu'on ne voit pas dans les marquages.

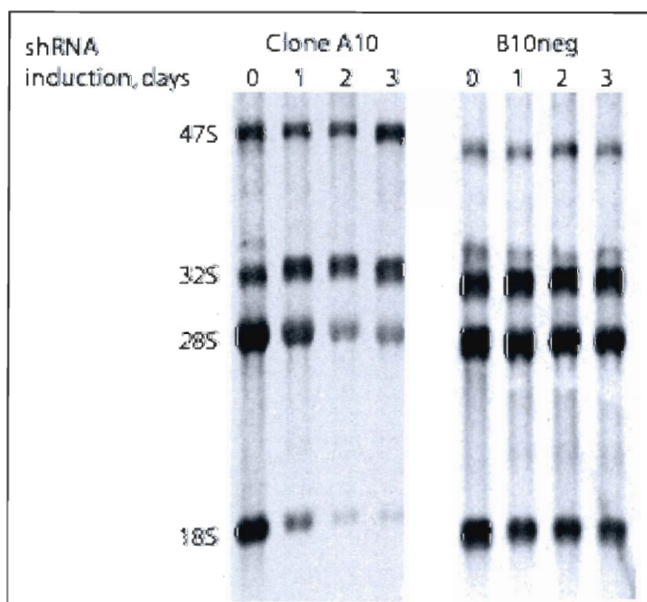


Figure 19 : Marquages métaboliques des clones A10 et B10 après traitements d'induction de 0, 1, 2 et 3 jours. Effet de perturbation de la maturation des ARNr lors d'une diminution de TTF-I montré par marquage métabolique. (Marquages fait par Victor Stefanovsky)

3.2.2 Analyses de type Western et marquage métabolique du clone de récupération A10 TTF-I

Des analyses de type Western, effectuées après des traitements d'induction de 0, 1, 2 et 3 jours d'induction simultanée du shRNAmir ciblant TTF-I et d'une forme pleine longueur de TTF-I portant une séquence Flag, démontrèrent une diminution de TTF-I ressemblant à celle observée chez le clone A10 après deux jours de traitement d'induction. Par contre, au troisième jour du traitement d'induction, une bonne induction de la forme pleine longueur TTF-I Flag est observée ce qui compense pour le déficit en TTF-I créé par l'induction du shRNAmir (figure 20). C'est donc après trois jours d'induction que la récupération de la diminution de TTF-I se devient notable.

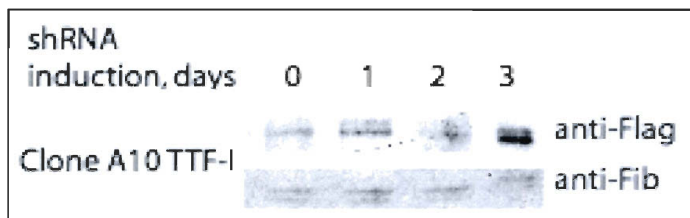


Figure 20. Analyses de type Western des protéines du clone A10 et du clone de récupération A10 TTF-I Flag.

Les marquages métaboliques effectués sur le clone de récupération A10 TTF-I Flag démontrèrent un patron de maturation des ARNr ressemblant fortement à celui du clone A10 après un traitement d'induction de 2 jours du shRNAmir ciblant TTF-I. Par contre, après 3 jours de traitement d'induction, donc au moment où l'expression de la forme pleine longueur flag de TTF-I est efficace, on observe une récupération quasi totale d'un patron normal de la maturation des ARNr (figure 21).

On peut donc conclure que les effets que l'inhibition de la maturation des ARNr que l'on observait suite à l'induction d'une diminution de TTF-I était bel et bien due à cette diminution de TTF-I et non à un effet indirect.

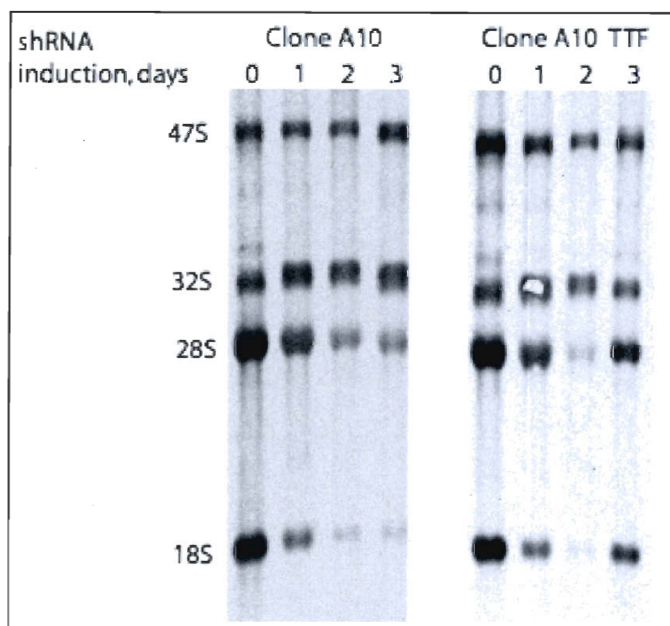


Figure 21 : Marquages métaboliques des clones A10 et A10 TTF-I. (Marquages faits par Victor Stefanovsky)

Le rapport entre l'ARNr 47S et l'ARN 18S ainsi que celui entre l'ARN 47S et l'ARN 28S obtenus pour l'expérience de marquage métabolique montré dans la figure 21 indiquaient clairement une inhibition des étapes précoces de la maturation des ARNr. Le rapport de l'ARN 47S sur l'ARN 18S, augmentant d'un facteur de 12 lorsqu'on passe d'une population non traitée à une population traitée, indiquait une inhibition importante du clivage de l'ARN 47S et de la production de l'ARN 18S. De son côté, le rapport de l'ARN 47S sur l'ARN 28S, augmentant d'un facteur d'environ 5 lorsqu'on passe d'une population de cellules non traitées à une population de cellules traitées, démontrait une inhibition également marquante du clivage de l'ARN 32S et de la production de l'ARN 28S (figure 22). De son côté, jusqu'à 2 jours de traitement d'induction, le clone de récupération A10 TTF-I voit ses rapports fluctuer de la même façon que ceux du clone A10. Par contre, au troisième jour de traitement d'induction, lorsqu'on obtient une bonne surexpression de la forme pleine longueur de TTF-I, les rapports redescendent à des niveaux comparables aux niveaux de ceux du clone négatif B10.

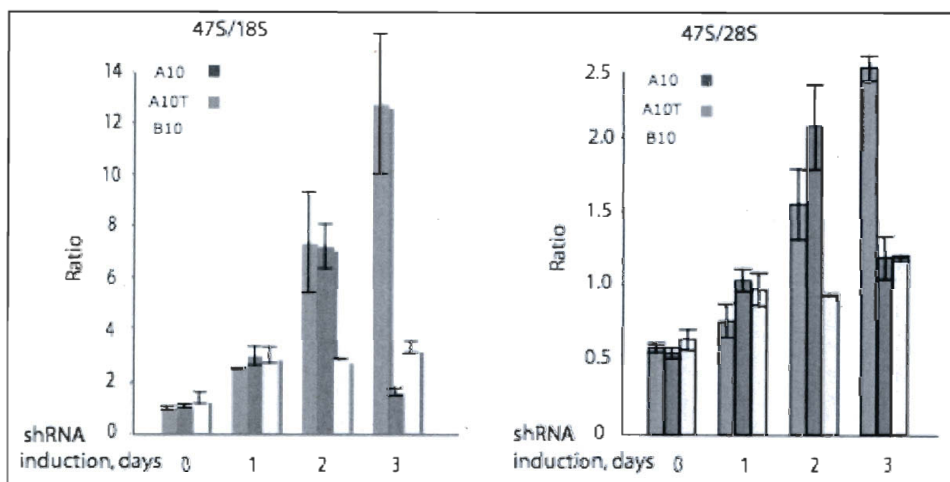


Figure 22. Histogrammes démontrant les rapports 47S/18S et 47S/28S.

3.2.3 Analyse par FACS des clones A10, B10 et A10 TTF-I

Les analyses par FACS caractérisant la ploïdie des cellules du clone A10 ont démontré une augmentation de cellules se trouvant dans la phase G1 de 46 % à 61.8 % de la population testée lorsqu'on passe d'une population non induite à une population induite pendant 2 jours respectivement. Ces analyses ont également montré une diminution de cellules se trouvant en phase S, soit de 37.6 % à 26.2 %, lorsqu'on passe d'une population non traitée à une population où le shRNAmir ciblant TTF-I fut traitée pendant une période de 2 jours. Aucune variation appréciable fut observée concernant le pourcentage des populations du clone A10 testées se trouvant en phase G2/M (figure 23, bleu).

Les analyses par FACS caractérisant la ploïdie des cellules du clone A10 TTF-I ont démontré un patron très similaire à celui observé pour le clone B10 servant de control négatif (figure 23, rouge (A10 TTF-I) et jaune (B10)). Lorsqu'on passe de cellules non traitées aux cellules traitées pendant 2 jours, on voit une augmentation de 48.4 % à 53.3 % des cellules du clone B10 se trouvant en phase G1 tandis que, chez le clone A10 TTF-I, on

voit une augmentation de 48.8 % à 54.7 % des cellules se trouvant en phase G1. Il s'agit d'une augmentation plus faible que celle de 15,8 % observée chez le clone A10. Concernant la phase S, le même processus est observé. On voit une diminution similaire chez le clone B10 et A10 TTF-I mais qui ne se compare pas à la diminution observée chez le clone A10. Chez le clone A10, on a une diminution de 37.6 % à 26.2 % après un traitement d'induction de 2 jours. Chez le clone B10, lorsqu'on passe de cellules non traitées aux cellules traitées pendant deux jours, on a une diminution minimale de 38.3 % à 32.2 % et chez le clone A10 TTF-I on a une diminution tout aussi minimale de 33.8 % à 31.9 % (voir tableau 1).

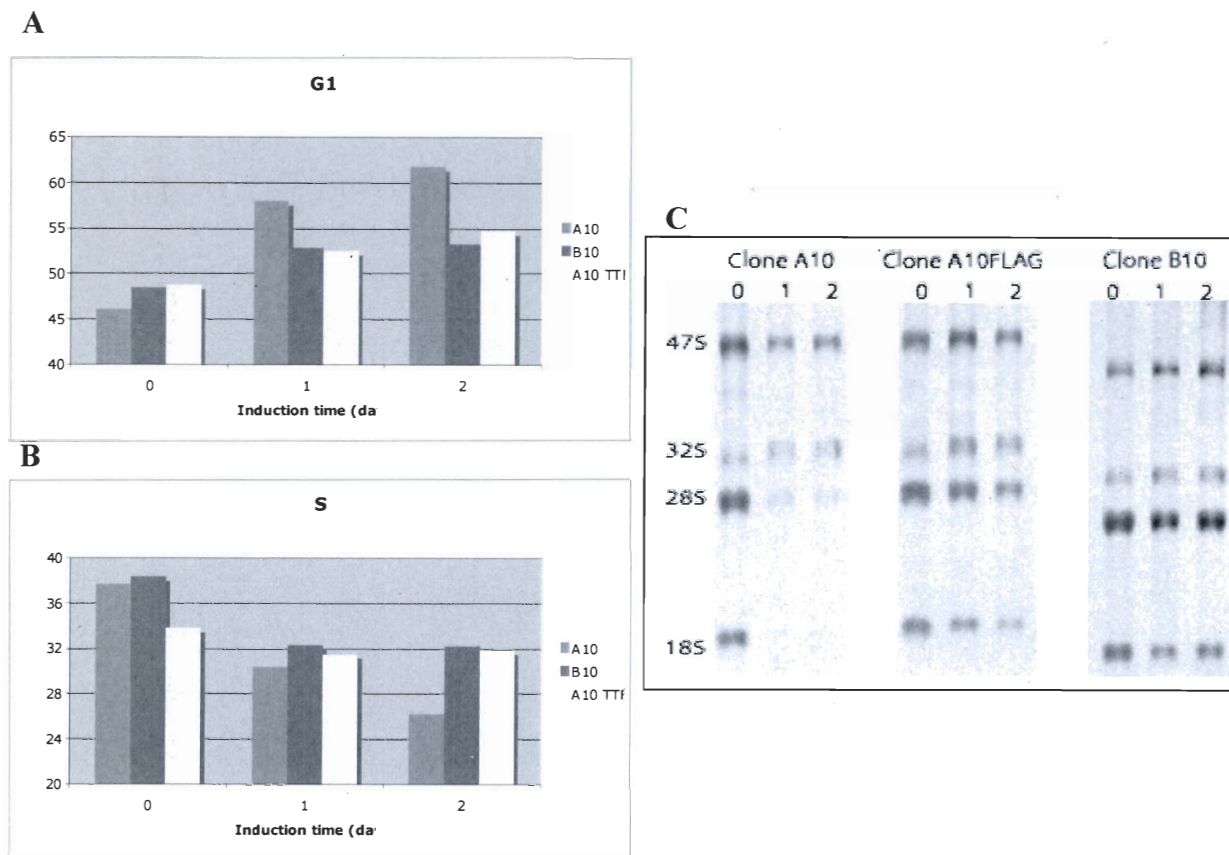


Figure 23. Analyse de ploïdie par FACS, histogrammes et marquages métaboliques correspondant. A) Histogramme des données obtenues pour la phase G1. Augmentation du clone A10 (bleu) après 1 et 2 jours d'induction. B) Histogramme des données obtenues pour la phase S. Diminution du clone A10 (bleu) après 1 et 2 jours de traitement d'induction. C) Marquage métaboliques des trois clones effectué en parallèle avec l'analyse par FACS. (Marquages faits par Victor Stefanovsky)

Tableau 1. Données brutes de l'analyse par FACS.

Phase	G1			S			G2		
Temps d'ind. (J)	0	1	2	0	1	2	0	1	2
A10	46.0	58.0	61.8	16.4	11.5	11.9	37.6	30.4	26.2
B10	48.4	52.9	53.3	13.4	14.8	14.5	38.3	32.3	32.2
A10 TTF-I	48.8	52.5	54.7	17.5	16.0	13.4	33.8	31.5	31.9

Chapitre 4 Discussion et conclusion

4.1 UBF

Depuis la caractérisation des fonctions d'UBF dans l'initiation de la transcription ribosomique ainsi que la découverte de son nouveau rôle dans la régulation de l'élongation de la transcription ribosomique, il a toujours été présumé qu'il est essentiel au bon déroulement de la transcription ribosomique, de la biogenèse des ribosomes et, conséquemment, est nécessaire à la survie. Par contre, il existe des données indiquant qu'il serait possible qu'UBF ne soit pas du tout nécessaire à la survie. Des modèles cellulaires simulant une diminution de plus de 80 % d'UBF démontre un taux de survie cellulaire tout à fait normale (Ross Hannan, communication personnelle).

En recherche d'une réponse à la nécessité ou non du facteur de transcription ribosomique UBF, nous avons développé un modèle de désactivation conditionnelle d'une ou deux allèles codant pour UBF chez la souris.

Mes expériences concernant le facteur de transcription ribosomique UBF, en ce moment, permettent seulement de conclure que la perte d'un allèle codant pour le facteur de transcription ribosomique UBF n'induit aucun défaut visible chez la souris, ni au niveau développemental ou comportemental. Ceci concorde avec les données obtenues par le laboratoire Hannan (Ross Hannan, communication personnelle) qui indiquent qu'une diminution de 80 % n'induit aucune perturbation de la survie cellulaire. De plus, quoiqu'il soit possible qu'on ne connaît pas tous les rôles remplit par UBF, la concentration nucléolaire d'UBF semble excédentaire par rapport à la quantité nécessaire pour remplir ses fonctions dans l'initiation et l'élongation de la transcription ribosomique (36). Ceci appuie l'idée que même une diminution de 80 % n'affecterait pas la capacité d'UBF de remplir ses fonctions. Notre modèle d'inactivation d'un allèle codant pour UBF, ne démontrant aucun effet autant au niveau développemental que comportemental, est donc très bien justifié ainsi que relativement prévisible.

La future inactivation des deux allèles codant pour UBF, résultant en une élimination totale du facteur de transcription ribosomique, permettra de déterminer l'importance de ce facteur de transcription pour la survie de la souris. Des études, également élaborés dans le laboratoire Hannan, démontrent qu'une diminution de approchant le 100 % d'UBF induit une mortalité cellulaire flagrante et soudaine lorsque comparé à la diminution de 80 % (Ross Hannan, communication personnelle). D'après les observations du laboratoire Hannan, nous nous attendons à une mortalité pré-natale de 100 % des animaux chez lesquels l'inactivation des deux gènes codant pour UBF aurait été effectuée (Ross Hannan, communication personnelle). Nous visons d'observer plus spécifiquement à quel étape du développement la mort est induite pour déterminer à quel point dans le développement UBF devient essentiel. Nous envisageons de voir la mortalité très tôt dans le développement comme la production de ribosomes est primordiale à la synthèse protéique.

4.2 TTF-I

Le gène $INK^{p14/ARF}$ codant pour la protéine ARF est un suppresseur de tumeur très bien connu pour la régulation par sa protéine de la stabilité de p53 par son interaction compétitif avec MDM2, l'ubiquitine ligase E3 de p53. Par contre, ARF est également bien connu pour induire la perturbation générale du processus de maturation des ARNr. Il est connu qu'ARF provoque la dégradation de B23, une protéine catalysant le clivage du précurseur 32S pour former les ARN 28S et 5,8S. Par contre, quoique la dégradation ARF-dépendante de B23 soit sûrement un élément responsable de la suppression du processus de la maturation des ARNr observée lors d'une induction d'ARF, le fait qu'on observe un effet sur tout les deux le 28S et le 18S indique clairement que B23 n'est pas le seul joueur responsable.

Quand l'interaction entre TTF-I et ARF fut confirmée dans le laboratoire Moss, nous nous sommes immédiatement questionnés sur la possibilité que TTF-I puisse être un lien entre ARF et son effet dévastateur sur le processus de la maturation des ARNr. J'ai donc développé un modèle cellulaire dans lequel je pouvais induire une diminution du facteur de transcription ribosomique TTF-I à l'aide d'une technologie d'interférence à l'ARN.

À l'aide de ce modèle, j'ai démontré par marquages métaboliques qu'une diminution de TTF-I a un effet inhibiteur sur la transcription ribosomique après 48 heures d'induction, où on voit une inhibition importante de la maturation des ARNr et aucune accumulation du précurseur 47S. Un effet marquant sur la maturation des ARNr fut également observé. Les marquages métaboliques indiquent qu'après une période d'induction du shRNA ciblant TTF-I de 48 heures, on observe une perturbation importante et générale du processus de maturation des ARNr. De plus, on observe un patron de maturation ressemblant davantage au patron de maturation des ARNr observé lors d'une induction d'ARF, ce qui soutient la théorie que TTF-I puisse être le lien entre ARF et son effet d'inhibiteur de la maturation des ARNr.

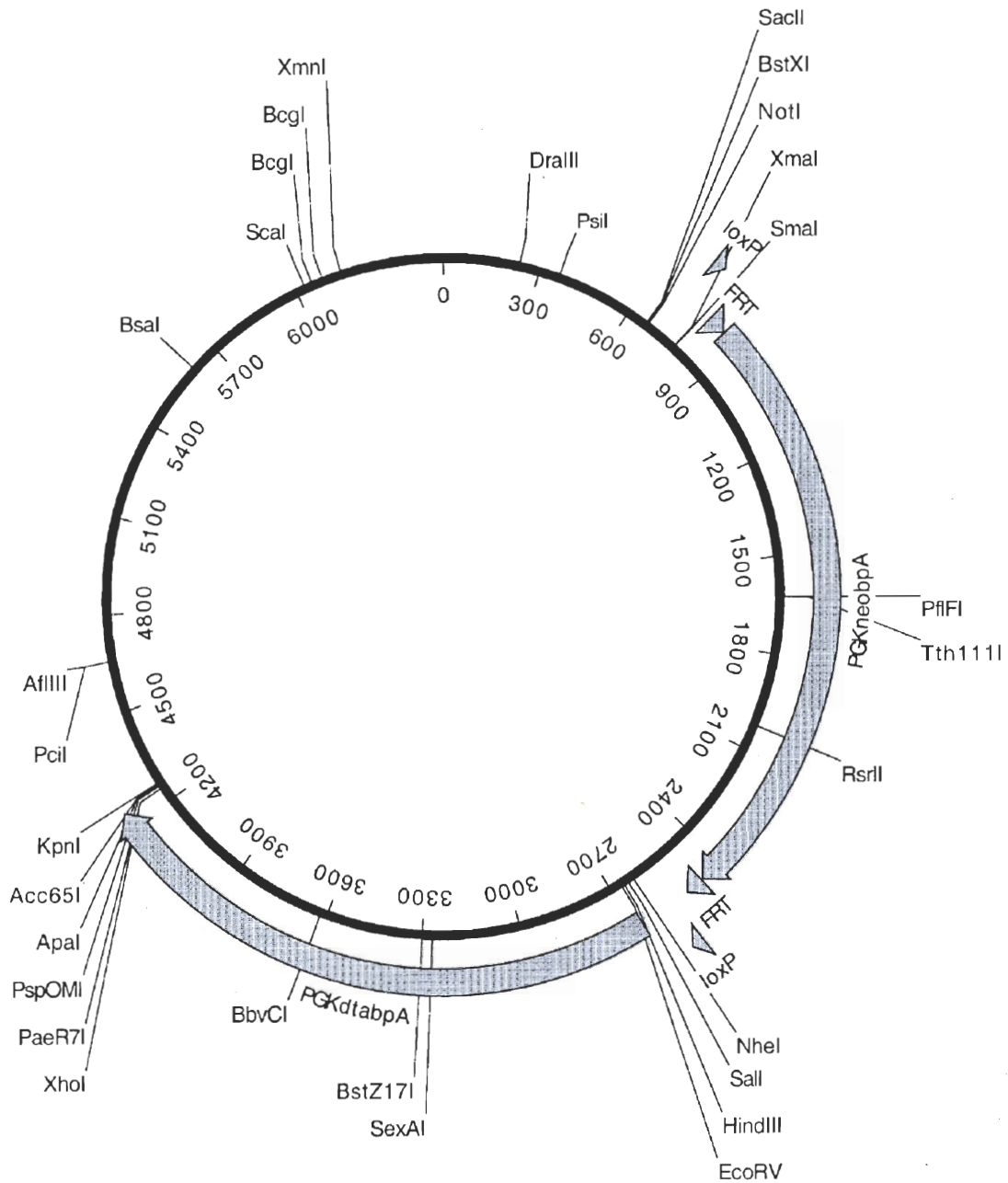
Des analyses par FACS permirent également de déterminer qu'une diminution de TTF-I induit une perturbation du cycle cellulaire ressemblant à un arrêt en phase G1. Ce résultat n'est pas très surprenant si on considère que la cellule se trouve en difficulté de produire des ARNr matures ce qui perturbe sûrement son taux de synthèse protéique. Des études élaborées dans le laboratoire Moss en parallèle avec les études décrites ci-dessus ont bien démontré une interaction entre TTF-I et MDM2 qui induit l'ubiquitination de TTF-I (Frédéric Lessard, communication personnelle). L'ajout d'ARF avec TTF-I et MDM2 induit la suppression de l'ubiquitination de TTF-I par MDM2. Par contre, nous avons récemment démontré que cette ubiquitination n'était pas dépendante de la compartimentation de MDM2 ce qui laisse à supposer qu'ARF pourrait agir comme l'ubiquitine ligase de TTF-I dans le nucléole (Frédéric Lessard, communication personnelle).

Suite aux études décrites au cours de ce travail, nous proposons un modèle de compétition entre ARF et MDM2 pour leur site de liaison avec le facteur de transcription TTF-I. Ce modèle suggère que l'induction d'ARF puisse gérer le cycle cellulaire de façon p53-indépendante. ARF sequestrerait alors MDM2 au nucléole, comme il est bien connu, et, vu son affinité plus forte pour TTF-I, se séparerait de MDM2 pour se lier à TTF-I et induire son ubiquitination et sa délocalisation/dégradation. Ceci induirait possiblement une diminution de TTF-I semblable à celle que nous avons réussi à reproduire dans les cellules

du clone A10 utilisées dans le cadre des études décrites ci-dessus. Cette diminution pourrait être un élément d'une voie de signalisation résultant en la perturbation de la biogenèse ribosomique et le ralentissement de la progression du cycle cellulaire. Cette voie serait donc possiblement un moyen d'induire l'apoptose de façon p53-indépendante.

Annexe A Vecteur pGKneoF2L2dta

PGKneoF2L2DTA



Annexe B gUBFexons

```

1 GCGGTCGGCG CTCTGCGCGG GGTTCCTTCC GTGCGTGTTG GGGTGGCTGG GTGGTGGCGG
61 CGGCGTCTCC GGCCCCGGGT GGTTCCGGGA CGGGGGACAA GCTAGGCCCG TTCTCCGACT
121 GETCGCCTGC CCGGACAGGC GGGGACC CGG TTGGGAGGTC GGGAGGGGGG TAGCAGCGGG
181 AATCCAGATC TAGTCCCCGG GGGCGGTCCG GCCGCTGCCG TCCCCGGGCTG GCGCGCGCTG
241 CGCGGCGTCC GGGTCCCCGC CGGGTTGCGG AGCGGGGGGG AACCGGCCGG GGAAAAGCGG
301 GAGGAGGAGA CTGAGGCGCG TGCCCCGCTC CATGCCCGCG CCGCCCTTT ACCCGCCCTT
361 CCTCCCCCGC CCTCCAGCTC GGGGCCCTCC CGGGGGGGGG GCTCACCGAG GAGGAGGAGG
421 AGGAGAATTT TTTTTTTTTT TTTTTGCCCG GGTGGGGGAA GGAGGCCGGA GGGCGGGAGC
481 TAGCTGCACG CGGGAGCTGG GAGCAGTCTC TCGCGTGGGC AGGGGAGGGC GCATGCGGCA

541 CCGCCTGGCT CTGGGGGCTG GGGTAGAGAA GAGTGGGGCT CACTCCTGCA CCCACTGATG

601 AAGTCTATGA GCCTCCTGTT CGGGTCTCGC TGAGAGTGTG GACCTATGCC CCCTCCCATG

661 TGTGAGGGGG TGGGATAGAA AGCCCCCTC CTCTCAGCCT CCTTAAGTGG GTTTGGTGTG

721 TCTTCAAAGG GGTGAGGTGG CTTTGACCCC GGGTGGCCCG GCCAGCGCGA CCGAGGAGGT

781 GGCTGGACAG CTGGAGAATG AACGGAGAAG CGGACTGTCC CACAGACCTG GAAATGGCCG

841 CCCCCAAAGG CCAAGGTATG GGTCCCCAGC TTCTCTTTT AACTTGTCT TTTTTCACAC

901 ACGAGCTCTC CAGCCTTGTG AAAGGTTCTT CTCAGGCTTC GTTCTGTGCA CTGGCAGACA

961 GTCTTAAGTC TTAGAAAGTG AAGCATCTGT CACATGGGGG TTTGGCCAAA TCCAAATTAC

1021 TTGGCCTTGA GCTTAGAACT TGAGTCTTTA CGATCTCTTG CTATGAATGA GGGTCACAGG
      ↓
1081 GAAGACTCTT GGAAGCCAGC CTTCTTGTT TCTTAGCTTG AAGTATCACA CCTTAGTGGG
1141 GATTTTCACT AGAGGCAGGT GGAAAACAGG GAAGGGGATT GTGGTTTATG GCTCCAAGCC
1201 TTAGGAATTA TAGATGCCCC GACCCTAGCC ACCTCTGTCA GCAGTGTAT GTTTATGACA
1261 TGGAGGGTAG TAGGAAACTG GGCATCTGCC AATGTTTGTG AGACATCAGG GGAGAGAGGA
1321 TTATGGGCCA TGTGACCCTT TTCTGCCGAA ACCGGCCAG GTTACCAGAT GCAAATGAAA
1381 GTCAGGAGCT CTTTTGCATC CTGGCCAAGG GTTCCCCAG CCEAGCCTCC ATAGCAGAGA
1441 GGCTCAGAGC TGTCTCTGGG CTGCACTTTA GCAGCTGAAA ATAATTGGGC TAAGATGTCA
1501 ACTTGGAGTT CTGGGGTTCT CCAGAGACCA AGGCCCTGAG AACTCTGTCC ACCTGCTTGC
1561 CTTTTCTCAG AACTACTGTG TATGGTGCTA ATGTTTGAAT TCCACTTTTC TCAGTTGCCA
1621 GAAATGCTGC TTTGGTCTCC CTTAAAGTGA CTAGAGTGGT GGAGTACCTG CCTTTAGTTG
1681 TTGATCTCCA GCTGTGCTGG ACAGACATCT TCACTGGGAG CCTTAGGACT CACACCTCAA
1741 CCTCAGGCCT TGCATGTTTG ACACTCACAT AGAGCCTGAC CACATTTAGA TACGTTCTTT
1801 CCCTGATCCC TCCCTTTCTG ATGAGCCCTT TGTCCATAGG CCCTAAATCA CTAGACTTCC
1861 CACTCCATCT CATACTGTAA ATAGGGGCCC ATGGCAGCCT AGCATGTTAA AAGTGATTGC
1921 TTTGAGGTAA GCAAGACAGG ATCCCAAGT TAACCTAAGT ATGGTGGTTA TTTTATCTGG
1981 TCEAGAGTCC CTTCCCTGAT TTAATAGGAC CACGGTTATT TTTCTTTTTT AGGACTGAGC
2041 CATGTA CTGG TTCAGATGAG AAGCAACCAG GGGCTTTGGG GAGGAGGGGG TGAACTCAGA
2101 GGCTGGGGAA CAGATCAAGA GAAGGGCATG AGCCAGGTGT GGTGACTTCT CTTACATGTC
2161 ACAGACEGCT GGTCCCAGGA AGATATGCTG ACTCTGCTGG AATGCATGAA GAACAACCTC
2221 CCATCCAACG ACAGCTCCAA GTTCAAAAAC ACAGAGTCGC ACATGGATTG GGAAAAAGTT
2281 CGGTTTAAAG ATTTTTCAGG AGATATGTGC AAGCTCAAAT GGGTGGAGAT TTCTAACGAG
2341 GTAAGTGCTT CCEACTTTTT GACTCCTGTA AATAAATACA TATTGTATAT GCTATTTTTT
2401 TTTCTTTCAG AAACAGGGTT TCTCTGTGTA GECCTGGCTG TCCTGGAAC CACTCTGTAG
2461 ACCAGGCTGG CTTGACCTC AAATCCGCCT GECCTGCCT CCTGAGTGT GGGATTAAGG
2521 GEGTGGCCCA CCAAGCCCGG CTGTGTATAT GCTTTTCATC TCAGAGAAAA CGGGGAAAGC
2581 AAACCAGTCA CTTTGGACAG AAGGCCTTCA CGTGTCTTC TGTGAGCTCT AATGTATGCC
2641 TTAGGGGAGG AAGTGGCCTG GGCATAGCA AECGCCTAGT GCTCACAGT ETACCACAA
2701 CTTCTAGGTG ACTTTGGATA CTCTAGGGGC TGAATGAGAT GCAGGCATGG AAGCTACGTT
2761 GAAATCAGTC TGTGACTGCT CTTAGGTTGT CCCCACCTAC TTGGCCCTCT GTAGCAGATA
2821 TGAGCGAGTG CCTCTGGGTC AGAAGTTGCC TATAATCTAT GTTGTGCTT TATTTTCTC

```

2881 ATTGAACTCA GTGTGGTGG GGGCAGTGCT AACACTGTAA AGGGATGCTG GACTATGCAG
 2941 TGATGTTTCC CAAATTCCTT TCTTCCTGTT TGCTCCCCCA GGTAAGGAAG TTCCTGACAT
 3001 TGACAGAATT GATCCTTGAT GCTCAGGAAC ATGTTAAAAA CCCTTACAAA GGCAAAAAGC
 3061 TCAAGGTGAG TTACCAGGAG GAGAAGCTCG CGTCAGGGAA GAGGGGTTTA AAGGATAGGT
 3121 GGCATCTAAC CCCGCTTTC TGTGTTCCAG AAACACCCGG ATTTTCCAAA GAAACCTCTC
 3181 ACCCCTTACT TCCGCTTCTT CATGGAGAAG CCGGCCAAGT ACGCGAAGCT CCACCCGGAG
 3241 ATGAGCAACC TGGACCTGAC TAAGATCCTG TCTAAGAAAT ACAAGGAACT TCCAGAGAAG
 3301 AAGAAGGTGG GGGGAGGGGG GGCTCAGGTG TGGGGAGGGT AGTTATACTT GCAGGAGGGG
 3361 GCAGCTGGTG TGGGAAGGTC AGCGGGGTGG GGATAGGCCT TAGAGAGACA AAAGGGACTC
 3421 CATATTGGGC GTGTGGAGGG GTCAACACAA CAGTGTAGTT GTTTTGGAGG TCACCCGGGT
 3481 ACCTATCCCC CTCCTGGCCC ACACATGGTC AGACAGGACC CATTGCAGGG GAGGACCCTG
 3541 AAGGCGTTCA GACTGCTCCT GTACCCCA CAACAAACAGC CACACTCCCT GTGAATCTGT
 3601 GCAGCCATTC TCCTACCAC CATGATACTT GAGTAGACAA GAGACCCAGG AAAGGGGAGA
 3661 GACTGGTTGT CCTGAGCAAG GACTGGGCA TAGGAGTGCT GAGTAGCTTG AGGCTTCCAG
 3721 CTAATGATG CTGGAACACA CTTGAGTTTG GAACTCTTC TGCCCTCCAG TGCTCTTCCC
 3781 CCTGCCGCGT CACATAAGTG ACCTTGTTTT CCGGTGTACA AGGGTACACG GTCTCTCCTT
 3841 GCCTCAGGCT GCTTCTCCT ACAGAAACAG ACCCTGTCC AGATTCTCAG GGGTGTAGGC
 3901 CTTTAGGTAA ACGTTGTCCG AACCTECTGG GCAGAGATGG ATAAAGCCCA AGACAAGCTC
 3961 AGGGGGGTTT CCTGGAAGAC AGGGAAGCAA AATACTGAAG GGAGTTCAAC ACGTTAAAGA
 4021 TGGGAGAGAG CCAAACGTGA GGAGGAGATG CTGGGTGATG AGGCCAAAGG TGTCAGTGCC
 4081 GGGCAGTAGG GTCTGAAGGA TGACACTGG TGGGCAAAGA ACACAGATG AAACGAATTA
 4141 ATCTGGCTGA GCTCATATGC TCTTACTGTT AAATCCAAAA TGGGATAGGC TTGGTTGGGT
 4201 AAAACCAAGT GTCTGTGGCC CATACCCAAG ECCAAGTAGC ATTAAGTGGC AGGGCTGCCA
 4261 TTGACCCCAT GGGTGAGGAC TTGGGACTGT GACTACACAC ACCACCAGAC CCTGAGGGG
 4321 TGGGAGAGAG AGGCTAAGAA GCAGAAGCAG GGAGGGACAG AGAAACTTGA GTGGAGAAAG
 4381 CTTAGGCACG GGCACACTAA TGTGGGCTG TCATATTGTT GCCGGTCCGC TGTGTCTGGT
 4441 CTTTCAGGTA AGTCACCTCA GTACTCCTGA TTGAGGCGTG GAGGGTGAAC CCTGAGATGC
 4501 CTTTTAAGTT CCGCTCTGAG GAGGACTGAG GGTGCCCTAG GAGGGCCGTC CTGTTTCTGG
 4561 TTTCTGTTGG GAAGCATGGT GSAATGAGC TGCCCTCCTG CTTGCTCCTG GTGCCTCTTA
 4621 EAAGGAGGAG TCTAGTTCAG TTGTGAGCCT CTGGTCCCTT CCAAGTCTAT CTTGACCCAG
 4681 AATTGAGAAA GGAAGGAAGG AGAAATGGAT GTTATGCAAG AGGGAAAGAG CATAAGAGGA
 4741 GGGAGGGGTT TCTAAAAGCC TGGGGCTCCA GGAGCACAGA GGAAGGGACA AGGCAGGAGG
 4801 GGCAGTGAC CAAGAAGACA GSAATGCCGG AGACCCAGAG CTGGTCTGG ATGGGAAAGA
 4861 AACTGCAAT TTAGGCCATT TATTGGAGG TGGTTTACGT TGTGAGAAT CATCTCTGC
 4921 EETTCAACA ATATCCTCTG CTGCTTCAAG AGCAGAATTA AGCCTTCTG GTGCTGTTAG
 4981 CCACCCCAAG GGGGACAGAC CAACATCAGC TGCCACAGAG ATGGTGGGAA GAGGGAGCAC
 5041 AGCAGCCAGA GAGCGCCACG AGACTCAAGG GAGTTATGTG GTATTAGAGA AAGTGTCTGG
 5101 TAGTCCGAAC CTGTACAGT TCACCTACTG GGTGATGTGA TGTCTCCTGG CTTCTGGGGC
 5161 ATCTGTCTT AATATGGAGA TGGGTGACTG GAGTCTCC TGAANAATCC ACTATCTGGC
 5221 TGTTAGTCA CAAGCTTAAT GTAAGTCCAG CTCACTAGAG GCACAGGAAC CAAGCATCTA
 5281 AAATCATAGC AGGAAGCAAG GCAGTCAAG AGGAGGGTGG CTTTTCTAG ATCTGGGTGA
 5341 AGTAGGCCTT GGGTCTGGT TGACTCCATC CECTCCTCC CTCAGATGAA ATATATTGAG
 5401 GACTCCAGA GGGAGAAACA GGAGTTCGAG CGAAAACCTGG CCCGATTGAG GTAAGGCAGA
 5461 GGAGGGCTAT GGGGCACTGG GTGGGCTAGG ATAAACGTAC TGTCTGAGAC TAGAAGTGC
 5521 GTCATGAA ACGTGGAAAG CTTGTGTAGA CTGTAGTGC AGGTTCAAGG GCAGGGACAG
 5581 GTTGCAGCC ACAAACTTCC AECGAGETCC TGCAGGAAG ECTAAAAGGC TTGGCTGGG
 5641 CAGCTAGCTG GGGTCTGCCC TAGCGGTGTC CECTGCTGAC CETTCTCCG GTECCCTGGT
 5701 TAGGGAGGAT CACCCTGACC TTATCCAGAA TGCCAAGAAG TCGGACATCC CCGAGAAACC
 5761 CAAAACCTCC CAGCAACTGT GGTACACCCA CGAGAAGAAG GTGTATCTCA AAGTGGCGCC
 5821 GGATGTGAGT GTCTGCCCAA AGGCTAGGGG CCGAGGGCAC ACGGCGGTGG EAAGGGGGGA
 5881 GCGCGCCTG GTGGCTGGT ATGGTGCAGG GAGCAGGAG AGGAGGCCTC TCCACAGGGG
 5941 GGGGGATTGC ATGGACAGGG CCTGGCCAG CTGGGCTGCG AATGAGTGTG TGTGTGAGCC
 6001 TGTCCCTCGC ACAAAGGGGG ATCCCTGCTT CTCACCTTA CECTCCTGGC ETGCGGTGGA
 6061 CACTTGCCTG ACCTCCTGTG GECGAGGGG GGGGGGCCC TCTGTGCCCC TCCCCCTC
 6121 CECTGCCCTT GGTGCTGCTG GTGTGTCTGA CCGCTTTTGG TTTGCAGGCC ACTACGAAGG
 6181 AGGTGAAGGA CTCCTGGGG AAGCAGTGGT CTCAGCTCTC GGACAAAAAG AGGCTGAAAT
 6241 GGATTCAATA GGCCCTGGAG CAGCGGAAGG AGTACGAGGT TAGGCTTCCG CTGCGCTCCT
 6301 CEECATCCGG CTETTCACGA GCETTTGCCC TGTGACTCGT GCCACAGCGT TGTGCAGTG
 6361 GCAGTGGTTC CCTGACCTTC TACTGAGGGA GGGGCTTTT GGGCCCCCTT CECTGTCTCC
 6421 TAGCTCTTA CAAAGCCCGT TCCACCCCA GAGATCTCAG GGTAGGGTGG AGCAGGCAC

6481 CATATTGCAG ATGACACAGC AGACACACAG ACACACGGCC ATCCCCAGCT TTGCTCCCTG
 6541 CCTCCCCCTCC CCAGCGGCTC TCCCCCTTAT GTTGTCCCCG CTAACCCAC ACCCCATTAC
 6601 CCTCCGCTCC CCTACCTCCC TCTGCAGGAG ATTATGCGGG ACTATATCCA GAAGCACCTT
 6661 GAGCTGAACA TCAGTGAGGA AGGCATCACC AAGTCCACCC TCACCAAGGC CGAGCGCCAG
 6721 CTCAAGGACA AGTTCGATGG GCGACCTACC AAGCCGCCTC CGTGAGCACC GCCCTGGATG
 6781 GGTGGGCGAG TGGGCCATCA GGGAGTTGTT CGTGAAGAAC TTGAACCCAG TCCCCTTTGC
 6841 TCATGGGTGT GCCTTCCTCC GGATTCAATA GGAACAGCTA CTCCTGTAC TGTGCGGAGC
 6901 TCATGGCCAA CATGAAGGAT GTGCCCAGCA CAGAGCGCAT GGTGCTATGC AGCCAGCAAT
 6961 GGAAGCTGCT CTCTCAGAAG GAGAAGGATG CCTATCACAA GAAATGTGAC CAGGTGCGCA
 7021 GGGCAGGTGC CAGGCCACCC CGAGCTCGGG GTCTTGACTT GGGGTTTAGC GCATGAGCTT
 7081 TGCCTGGGCT CAGTAACTCA CTGATTACAG GTGCCTCAGC CACCTGCCTT CAGCCTGGGC
 7141 CGGGTTTAGC CTCCCCTGTC TGTCAAGGCT CTTGGCTGCC ATCTTCAGGG GGTGAGAAGG
 7201 TTACATACAC CCAGTCCCTA GGGGCCTGCT GAGGCTGGCT GGCCCAAGGAG AATGGAGGCT
 7261 GACCCCAACT CACTGAATCC CCTTACTTTT CTAGAAAAAG AAAGATTATG AGGTAGAGCT
 7321 GCTGCGGTTT CTTGAGGTAA GTAGGCCACCA CCTTGAGGTG GGCAGAGGGC GCATTCTGGA
 7381 GTCCGAGGAG CCGGCCTACC TGCCTGCTGC AGCCCCATAC CCTTCTTCTT ACCTAGAGCT
 7441 TGCCGGAGGA AGAGCAGCAG CGGGTTCTGG GGGAGGAGAA GATGCTGAAC ATCAATAAGA
 7501 AGCAAAACCAC CAGTCCGGCC TCCAAGAAAGC CTTCAAGGGA AGGTGGCAAG GTGAGTGTCC
 7561 CATGCCCGTG GGGGTGGGGG CCAAGGATGGA GCCGCTCACA GGAGGAGGCT AGTGGCAATT
 7621 GTACCTCCGA TACTCCCGT ACTTCCCTTA GGGTGGCTCC GAGAAGCCCA AGCGGCTGT
 7681 GTCTGCTATG TTCATCTTCT CTGAGGAGAA GCGAAGGCAG CTCACAGGAG AACGACCTGA
 7741 GCTCTCCGAA AGCGAACTGA CCCGCCTTCT GGGCCGCATG TGGAAACGACT TGTCCGAGAA
 7801 GAAGAAAGTC GGGCCTTGA GAGACCCCTT ACTACTCTTC CCTAAGGGTC TCCTGGGCA
 7861 CTTCCATGCG CGCGGTTACA GCCGCTCCCC GGCACCAAGAA GTGAATCACA CGTGTACCGT
 7921 GTACCCGGGC TCAATTGCTG GGGCGGGAGC CGGAAGAAGG GAAGCTTTCA GCTTCTTGT
 7981 TGGCTCCCTT GGAGAGCGGC CCCATGGGTG GGGCGGAGCT TGGTGGACGT CACTGCTGCC
 8041 CACGGCTTCT GCCGGACCCG CCCTCCTCAA CAGGGAGCCG GCAACGAATG CTGGGTGGGC
 8101 TTAGCGCGCC CCTAGGGGT GGCCCGAATG TTAACATCCT TGCTTTTTCT ATAGGCTAAA
 8161 TACAAGGCCC GGGAGGCTGC GCTGAAGGCG CAGTCTGAGA GGAAGCCGGG CGGGGAGCGT
 8221 GAAGATAGGG GCAAGCTGCC GGAGTCGCCC AAGAGGGCTG AGGAGATCTG GCAGCAGAGT
 8281 GTCATCGGAG ACTATCTGGC CCGCTTCAAG GTAGCGGAGA GTGGGGAAGG ATCGGTTTAT
 8341 GGTCTCTAGC AACAGACCCC CTCCCATAAC TGATATCCTG GGTTTGTACC TTAGAATGAC
 8401 CGGGTAAAAG CCTTAAAAGC CATGGAGATG ACTTGAACA ACATGGAGAA GAAGGAGAAG
 8461 CTGATGTGGA TTAAGAAGGC AGCAGAAGAC CAAAAACGAT ATGAGGTGGG AAGGGGTTGG
 8521 GCCACCTGCC TCCATGATGG GCCAGGAGGG CCAGCTTTGT TTAAGACCCT GAGCCAGTCT
 8581 CTTAACTTCC GGCCTGGCAT AGGCTAGGTG GGCCTCAAGG TACTAGCTC TTGGGTGATT
 8641 TTGGCGGGGG GGGGGGGGGG GGGCGGGAGC GGACTACTTC CATTTCAGGG AACATTTTTG
 8701 AAACGACCCT CTTGGTGCGA TGACTTGTCC AGCAGTTGTT TTGAGAAAG TCCCTGCTATG
 8761 GATCCACAGT AGCTACCACT ACCAGCTCTA GCTCCTCTG CCTTAATCTC TGCCGAGTTG

 8821 AGATCTCCCC CGCCAGTGGG GTGGGGAGTG CGGGTGTGGG TGTGACCTCT CCGTCTCTCT

 8881 CCACAGAGAG AGTTAAGTGA GATGCGGGCC CCTCCAGCTG CTACAAACTC TTCCAAGAAG

 8941 ATGAAGTTCC AGGGAGAACC CAAGAACTT CCTATGTAAG CCTGAGGCTG GGACCTATGG

 9001 TGTAGACAGG GATTAGAAGG EGGETCCCTT AGGACCCTGA CTGTCCCTGT CACCCACCGC

 9061 TGCAGGAACG GTTACCAGAA GTTCTCCAG GAGCTGCTGT CCAATGGGGA GCTAAATCAC

 9121 CTGCCGCTGA AGGAGCGCAT GGTGGAGATT GGCAGCCGCT GGCAGCGCAT CTCCAGAGC

 9181 CAGAAGGAGC ACTATAAGAA GCTGGCGGAG GAGCAACAGA GGCAGTACAA GGTGCACTTG

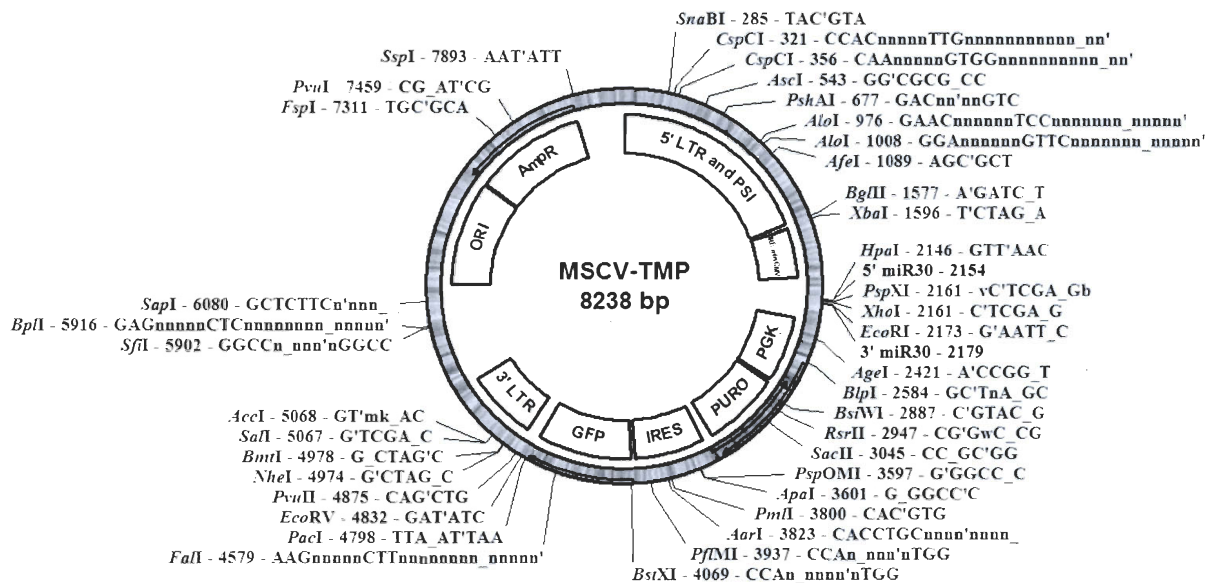
 9241 GACCTCTGGG TCAAGGTGAG AGAGAGGACA AAGGCACCTT GGAAGGGAGT GCCTGCAGGG

 9301 ACTGGGAAGT CCTGGGGGC AGTGGGTACT GACATTTTTT AAAGCTAAGC AAGCCAAGGT

 9361 ATCAAGTCAT TTGCCAAGGT TAENATAGTAG ACAGTTTGTG TAGACTGGGT GTCCTTCGTT

9421 CAAGCAAGGA CCAGGAGACT TGTAGGGCCT GGETAGGCTG GCAGTCTCCA CTGCTGTGCT
 9481 TGAATGGTCA CATTGTCCA GGGAGAATTA CCTGTCACTC AGATAGGCTA ACCAAAGACC
 9541 CAGAGGGATG GEAGGAATTC AGTGTTC AAG AATTTTGTCA GTCTTCGTCG TCATTTCAAA
 9601 GACTGGGGTC CAGGTGGGGT TGACCTCGTG AGTCATTGGG GGGGGGCATG CTTTGCAGTT
 9661 AAAGAAGCCC TAGGTACAGG GCTACCATTG GAAACGGCA GTTGGGGGTA GGGCATTGCT
 9721 ATGAAACTG ACTTGGTTCA GTGTTCA GAA TCAGGAGTTA TGTTCTGAGC CCCTAAAAGC
 9781 TTTCTGCAGG GACCCAAAGT TTAGGAGACT GAGTGTAAG ATAAGGTATG TGGGAGCTCT
 9841 GCCCAGTGA CGTCGGCGTA TGCAGCCAGC TGTAGGATGG GGTTGATCTT ATTCCAGTT
 9901 CTTTCTCCCC AGAGCCTGTC TCCCCAGGAC CGCGCAGCAT ACAAAGAATA CATCTCCAAT
 9961 GTAAGCAGGA GCACAAGGCA GTGGAGGGGG AGGCTGGAGG GACTCTGCAG GGGCTGGGAC
 10021 TCACTTCAGC CCCCTTCCCA TCCTTTCTGT CAGAAACGTA AGAACATGAC CAAGCTCCGA
 10081 GGCCCAAACC CCAAGTCTAG CCGGACCACC CTGCAGTCCA AGTCGGTAAG GCACCCCTGC
 10141 AAGGTGGGTG GGTGGCTGGC AAGGTGGGTG TATCTGGCTG CTGATGCGTC TCCACACCTC
 10201 CCAGGAGTCC GAGGAGGATG ACGATGAGGA GGAGGAGGAC GACGAGGAGG AGGAGGAAGA
 10261 GGAAGATGAT GAGAACGGTG ACTCTTCTGA GGATGGCGGG GACTCTTCTG AGTCCAGCAG
 10321 TGAAGATGAA AGCGAGGATG GGGATGAGGT GGGCAGGAGG CGTGGTGGGA GGGAGGGTTG
 10381 TTGTAGATCA CCAGGAGGGC CACACACACG GTGACGGTGG GGTCTTTATT CTCCCAGAAT
 10441 GATGATGACG ACGACGATGA AGATGACGAA GATGACGACG ATGAGGATGA AGACAACGAG
 10501 TCTGAGGGCA GTAGCTCCAG CTCTTCATCC TCAGGGGACT CTTCCGATTG TGACTCCAAC
 10561 TGAGGCTCAG CCTCCACCCC AGGCAGGCAG GCAGGCAGGC AGCCAAGGAG AGAGCCCTG
 10621 CAGAGCTCAT CTCCCCAACT GACAACCTTT GACAACCTTT GTCTCTCCCT GTGTTCTGTC
 10681 CCGTACCCTC CAGACTTCCC CACTTTCTTT CTTTCTTTCT TTTTGTGTTT TTAATCAGT
 10741 GGGGGGTAGG AGGCTGCATG AGCCCAAGCT AGGACTCTGC AGCCTTGGAG CCTCAGCTCC
 10801 AGGTTTCTCC AGGGACAGCA ACCATCAGAC TGAGCCAGCG CTGGACGGGC CCACCCCTGC
 10861 CCTCTTCTGC ATTTGCAGTT CCGGCATGGA CAATGGACTG GGGAGTTTGG GGGTGGGAGA
 10921 GAGTCTTAAA GAGTTTGGTG AGACCTCCAC ACCTGCAGCC TGCAGCAAGG TGGATGTTG
 10981 GGGGGCCTTT CTTTCCAGA

Annexe C MSCV-TMP « Tetracycline-regulated retroviral vector- SIN-TREmiR30-PIG»



Références

1. **Andersen, J., Lyon, CE; Fox, AH; Leung, AKL; Lam, YW; Steen, H; Mann, M; Lamond, AI.** 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current biology* **12**:1-11.
2. **Bazett-Jones, D. P., LeBlanc, B.; Herfort, M.; Moss, T.** 1994. Short-range DNA looping by *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**:1134-1137.
3. **Bell, S. P., Learned, R.M.; Jantzen, H.M.; Tjian, R.** 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and S11 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**:1192-1197.
4. **Bertwistle, D., Sugimoto, M; Sherr, CJ.** 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* **24**:985-996.
5. **Boisvert, F., van Koningsbruggen, S; Navascués, J; Lamond, AI.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews of molecular and cellular biology* **8**:574-585.
6. **Castle, T., Katz, A.; Richardson, A.** 1978. Comparison of RNA synthesis by liver nuclei from rats of various ages. *Mechanisms of ageing and development* **8**:383-395.
7. **Cavanaugh, A. H., Hempel, W.M.; Taylor, L.J.; Rogalsky, V.; Todorov, G.; Rothblum, L.I.** 1995. Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature* **374**:177-180.
8. **Chédin, S., Laferté, A.; Hoang, T.; Lafontaine, D.L.; Riva, M.; Carles, C.** 2007. Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell cycle* **6**:11-15.
9. **Chen, D., Belmont, AS; Huang, S.** 2004. Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **101**:15106-15111.
10. **Chen, D., Zhang, Z.; Li, M.; Wang, W; Li, Y.; Rayburn, E.R.; Hill, D.L.; Wang, H.; Zhang, R.** 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: Binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* **26**:5029-5037.
11. **Cheutin, T., O'donohue, M.F.; Beorchia, A.; Vandelaer, M.; Kaplan, H.; Deféver, B.; Ploton, D.; Thirty, M.** 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *Journal of cell science* **115**:3297-3307.
12. **Copenhaver, G. P., Putnam, C.D.; Denton, M.L.; Pikaard, C.S.** 1994. The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic acids research* **22**:2651-2657.
13. **Dai, M. S., Lu, H.** 2004. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *Journal of biology and chemistry* **279**:44475-44482.
14. **De Winter, R. F., Moss, T.** 1986. The ribosomal spacer in *Xenopus leavis* is transcribed as a part of the primary ribosomal RNA. *Nucleic acids research* **14**:6041-6051.
15. **De Winter, R. F., Moss, T.** 1986. Spacer promoters are essential for efficient enhancement of *X. leavis* ribosomal transcription. *Cell* **44**:313-318.

16. **Derenzini, M., Trerè, D.; Pession, A.; Govoni, M.; Sirri, V; Chieco, P.** 2000. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *Journal of pathology* **191**:181-186.
17. **Friedman, J. M., Chung, E.Y.; Darnell, J.E.** 1984. Gene expression during liver regeneration. *Journal of molecular biology* **179**:37-53.
18. **Friedrich, J. K., Panov, K.I; Cabart, P.; Russell, J.; Zomerdijk, J.C.** 2005. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *Journal of biology and chemistry* **280**:29551-29558.
19. **Gerber, J., Gögel, E; Berger, C, Wallisch, M; Müller, F; Grummt, I; Grummt, F.** 1997. Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell* **90**:559-567.
20. **Grinberg, A., CD, Hu; Kerpola, TK.** 2004. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Molecular and cellular biology* **24**:4294-4308.
21. **Grummt, I.** 2003. Life on a planet of it's own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes and development* **17**:1691-1702.
22. **Grummt, I., Pikaard CS.** 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Molecular cell biology* **4**:641-649.
23. **Grummt, I., Smith, V.A.; Grummt, F.** 1976. Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* **7**:439-445.
24. **Hannan, K., Brandenburger, Y; Jenkins, A; Sharkey, K; Cavanaugh, A; Rothblum, L; Moss, T; Poortinga, G; McArthur, GA; Pearson, RB; Hannan, RD.** 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology* **23**:8862-8877.
25. **Hannan, K., Hannan, RD; Rothblum, LI.** 1998. Transcription by RNA polymerase I. *Frontiers of bioscience* **3**:376-398.
26. **Hannan, R., Stefanovsky, V.; Arino, T.; Rothblum, L.; Moss, T.** 1999. Cellular regulation of ribosomal DNA transcription: both rat and *Xenopus* UBF1 stimulate rDNA transcription in 3T3 fibroblasts. *Nucleic acids research* **27**:1205-1213.
27. **Hannan, R., Stefanovsky, V; Taylor, L; Moss, T; Rothblum, LI.** 1996. Overexpression of the transcription factor UBF1 is sufficient to increase ribosomal DNA transcription in neonatal cardiomyocytes: Implications for cardiac hypertrophy. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **93**:8750-8755.
28. **Hernandez-Verdun, D., Louvert, E.** 2004. Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. *Médecine/sciences* **20**:37-44.
29. **Hock, R., Furusawa, T.; Ueda, T.; Bustin, M.** 2006. HMG chromosomal proteins in development and disease. *TRENDS in Cell Biology* **17**:72-79.
30. **Itahana, K., Bhat, K.P.; Jin, A.; Itahana, Y.; Hawke, D.; Kobayashi, R.; Zhang, Y.** 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular cell* **12**:1151-1164.
31. **Jansa, P., Grummt, I.** 1999. Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused

- transcription complexes from yeast and mouse. *Molecular and general genetics* **262**:508-14.
32. **Jansa, P., Mason, SW; Hoffman-Rohrer, U; Grummt, I.** 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *The european molecular biology organization journal* **17**:2855-2864.
 33. **Jantzen, H. M., Admon, A.; Bell S.P.; Tjian, R.** 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* **344**:830-836.
 34. **Jantzen, H. M., Chow, A.M.; King, D.S.; Tjian, R.** 1992. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes and development* **6**:1950-1963.
 35. **Kashley, M., Komissarova, N.** 2002. Transcription termination: primary intermediates and secondary adducts. *Journal of biology and chemistry* **277**:14501-14508.
 36. **Kermekchiev, M., Workman J.L.; Pikaard, C.S.** 1997. Nucleosome binding by the polymerase I activator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Molecular and cellular biology* **17**:5833-5842.
 37. **Kubbutat, M., Jones, SN; Vousden, KH.** 1997. Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature* **387**.
 38. **Kuhn, A., Grummt, I.** 1989. 3' end formation of mouse pre-rRNA involves both transcription termination and a specific processing reaction. *Genes and development* **3**:224-231.
 39. **Kuhn, A., Grummt, I.** 1992. Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: trans-activator and antirepressor. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **89**:7340-7344.
 40. **Kuhn, A., Voit, R; Stefanovsky, V; Evers, R; Bianchi, M; Grummt, I.** 1994. Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of the binding and transcriptional activity. *The european molecular biology organization journal* **13**:416-424.
 41. **Längst, G., Becker, PB; Grummt, I.** 1998. TTF-I determines the chromatin architecture of the rDNA promoter. *The european molecular biology organization journal* **17**:3135-3145.
 42. **Leary, D., Huang, S.** 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *Federation of european biochemical societies letters* **509**:145-150.
 43. **LeBlanc, B., Read, C.; Moss, T.** 1993. Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF-DNA interdomain interaction. *The european molecular biology organization journal* **12**:513-525.
 44. **Li, C., Mueller, JE; Elflin, M; Bryk, M.** 2008. Linker histone H1 represses recombination at the ribosomal DNA locus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **67**:906-919.
 45. **Lin, C.-Y., Navarro, S; Reddy, S; Comai, L.** 2006. CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic acids research* **34**:4752-4766.

46. **Lohrum, M. A., Ludwig, R.L.; Kubbutat, M.H.; Hanlon, M.; Vousden, K.H.** 2003. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer cell* **3**:577-587.
47. **Ma, H., Pederson, T.** 2007. Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G1 cell cycle arrest via the p53 pathways. *Molecular biology of the cell* **18**:2630-2650.
48. **MacInnes, A. W., Amsterdam, A.; Whittaker, C.A.; Hopkins, N.; Lees, J.A.** 2008. Loss of p53 synthesis in zebrafish tumors with ribosomal protein gene mutations. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **105**:10408-10413.
49. **Martindill, D., Riley, PR.** 2008. Cell cycle switch to endocycle: the nucleolus lends a hand. *Cell cycle* **7**:17-23.
50. **Mason, S., Sander, EE; Grummt, I.** 1997. Identification of a transcript release factor activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *The european molecular biology organization journal* **16**:163-172.
51. **Mason, S., Wallisch, M; Grummt, I.** 1997. RNA polymerase I transcription termination: similar mechanisms are employed by yeast and mammals. *Journal of molecular biology* **268**:229-234.
52. **McStay, B., Frazier, MW, Reeder, RH.** 1991. xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes and development* **5**:1957-1968.
53. **Mélèse, T., Xue, Z.** 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current opinion in cell biology* **7**:319-324.
54. **Meraner, J., Lechner, M; Loidl, A; Goralik-Schramel, M; Voit, R; Grummt, I; Loidl, P.** 2006. Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I. *Nucleic acids research* **34**:1798-1806.
55. **Merz, K., Hondele, M; Goetze, H; Stoeckle, U; Griesenbeck, J.** 2008. Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes and development* **22**:1190-1204.
56. **Montanaro, L., Treré, D.; Derenzini, M.** 2008. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *The American journal of pathology* **173**:301-310.
57. **Moss, T.** 1983. A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus leavis*. *Nature* **302**:223-228.
58. **Moss, T., Langlois, F; Gagnon-Kugler, T; Stefanovsky, V.** 2007. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosomal biogenesis. *Cellular and molecular life sciences* **64**:29-49.
59. **Moss, T., Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T.** 2006. A new paradigm for the regulation of the mammalian ribosomal RNA genes. *Biochemical society transactions* **34**:1079-1081.
60. **Moss, T., Stefanovsky, V.Y.** 2002. At the center of Eucaryotic life. *Cell* **109**:545-548.
61. **Muth, V., Nadaud, S; Grummt, I; Voit, R.** 2001. Acetylation of TAF₆₈, a subunit of TIF-IB/SL1, activates polymerase I transcription. *The european molecular biology organization journal* **20**:1353-1362.

62. **Németh, A., Strohner, R; Grummt, I; Längst, G.** 2004. The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes *in vivo*. *Nucleic acids research* **32**:4091-4099.
63. **O'Mahony, D. J., Rothblum, L.I.** 1991. Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **88**:3180-3184.
64. **O'Sullivan, A. C., Sullivan, G.J.; McStay, B.** 2002. UBF binding *in vivo* is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Molecular and cellular biology* **22**:657-668.
65. **Olson, M.** 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Science's signal transduction knowledge environment* **224**.
66. **Olson, M., Dundr, M; Szebeni, A.** 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *TRENDS in cell biology* **10**:189-196.
67. **Olson, M., Hingorani, K; Szebeni, A.** 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *International review of cytology* **219**:199-266.
68. **Panov, K. I., Friedrich, J.K.; Russell, J.; Zomerdijk, J.C.** 2006. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *The european molecular biology organization journal* **25**:3310-3322.
69. **Pelletier, G., Stefanovsky, VY; Faubladiet, M; Hirschler-Laszkiewicz, I; Savard, J; Rothblum, LI; Côté, J; Moss, T.** 2000. Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Molecular cell* **6**:1059-1066.
70. **Pendle, A., Clarck, GP; Boon, R; Lewandowska, D; Lam, YW; Andersen, J; Mann, M; Lamond, AI; Brown, JWS; Shaw, PJ.** 2005. Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Molecular biology of the cell* **16**:260-269.
71. **Poortinga, G., Hannan, KM; Snelling, H; Walkley, CR; Jenkins, A; Sharkey, K; Wall, M; Brandenburger, Y; Palatsides, M; Pearson, RB; McArthur, GA; Hannan, RD.** 2004. MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *The european molecular biology organization journal* **23**:3325-3335.
72. **Prieto, J.-L., McStay, B.** 2005. Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochemical society transactions* **33**.
73. **Pütter, V., Grummt, I.** 2002. Transcription termination factor TTF-I exhibits contrahelicase activity during DNA replication. *The european molecular biology organization journal* **3**:147-152.
74. **Roussel, P., André, C; Comai, L; Hernandez-Verdun, D.** 1996. The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *The journal of cell biology* **133**:235-246.
75. **Rubbi, C., Milner, J.** 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The european molecular biology organization journal* **22**:6068-6077.
76. **Ruggero, D., Pandolfi, P.** 2003. Does the ribosome translate cancer? *Nature reviews. Cancer* **3**:179-192.
77. **Russell, J., Zomerdijk, J.C.B.M.** 2005. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *TRENDS in biochemical sciences* **30**:87-96.

78. **Santoro, R., Li, J; Grummt, I.** 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature genetics* **32**:393-396.
79. **Schnapp, A., Pfliederer, C; Rosenbauer, H; Grummt, I.** 1990. A growth-dependant transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *The european molecular biology organization journal* **9**:2857-2863.
80. **Schneider, D., Michel, A; Sikes, ML; Vu, L; Dodd, JA; Salgia, S; Osheim, YN; Beyer, AL; Nomura, M.** 2007. Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Molecular cell* **26**:217-229.
81. **Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S; Roussel, P; Hernandez-Verdun, D.** 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* **129**:13-31.
82. **Smith, S. D., O'Mahony, D.J; Kinsella, B.J.; Rothblum, L.I.** 1993. Transcription from the rat 45S ribosomal DNA promoter does not require the factor UBF. *Gene expression* **3**:229-236.
83. **Stefanovsky, V., Langlois, F; Bazett-Jones, D; Pelletier, G; Moss, T.** 2006. ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* **45**:3626-3634.
84. **Stefanovsky, V., Langlois, F; Gagnon-Kugler, T; Rothblum, L; Moss, T.** 2006. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular cell* **21**:629-639.
85. **Stefanovsky, V., Moss, T.** 2006. Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count. *Cell cycle* **5**:735-739.
86. **Stefanovsky, V., Moss, T.** 2008. The splice variants of UBF differentially regulate RNA polymerase I transcription elongation in response to ERK phosphorylation. *Nucleic Acids Research* **36**:5093-5101.
87. **Stefanovsky, V. P., G; Bazett-Jones, DP; Crane-Robinson, C; Moss, T.** 2001. DNA looping in the RNA polymerase I enhancesome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Research* **29**:3241-3247.
88. **Stefanovsky, V. Y., Bazett-Jones, D. P.; Pelletier, G.; Moss, T.** 1996. The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic acids research* **24**:3208-3215.
89. **Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G.; Bazett-Jones, D. P.; Crane-Robinson, C.; Moss, T.** 2001. DNA looping in the RNA polymerase I enhancesome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic acids research* **29**:3241-3247.
90. **Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G.; Hannan, R.; Gagnon-Kugler, T.; Rothblum, L.I.; Moss, T.** 2001. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Molecular cell* **8**:1063-1073.

91. **Stoykova, A. S., Dudov, K.P.; Dabeva, M.D.; Hadjiolov, A.A.** 1983. Different of synthesis and turnover of ribosomal RNA in rat brain and liver. *Journal of neurochemistry* **41**:942-949.
92. **Strohner, R., Németh, A; Nightingale, KP; Grummt, I; Beker, PB; Längst, G.** 2004. Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Molecular and cellular biology* **24**:1791-1798.
93. **Sugimoto, M., Kuo, ML; Roussel, MF; Sherr, CJ.** 2003. Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Molecular cell* **11**:415-424.
94. **Sullivan, G., McStay, B.** 1998. Dimerization and HMG1 box domains 1-3 present in Xenopus UBF are sufficient for its role in transcriptional enhancement. *Nucleic acids research* **26**:3555-3561.
95. **Takagi, M., Absalon, M.J.; McLure, K.G.; Kastan, M.B.** 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**:49-63.
96. **Thomas, J. O., Travers, A.A.** 2001. HMG1 and 2, and related 'archetuctural' DNA-binding proteins. *Trends in biochemichal sciences* **26**:167-174.
97. **Tsai, R. Y., McKay, R.D.** 2002. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & Development* **16**:2991-3003.
98. **Tuan, J., Zhai, WG; Comai, L.** 1999. Recruitment of TATA-binding protein-TAF complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Molecular cell biology* **19**:2872-2879.
99. **Visintin, R., Amon, A.** 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current opinion in cell biology* **12**:372-377.
100. **Voit, R., Grummt, I.** 2001. Phosphorylation of UBF at serine 388 i required for interaction with rDNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* **98**:13631-13636.
101. **Voit, R., Hoffmann, M; Grummt, I.** 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *The european molecular biology organization journal* **18**:1891-1899.
102. **White, R. J.** 2004. RNA polymerase III transcription and cancer. *Oncogene* **23**:3208-3216.
103. **Yonaha, M., Proudfoot, N.J.** 2000. Transcription termination and coupled polyadenylation in vitro. *The european molecular biology organization journal* **19**:3770-3777.
104. **Zahradka, P., Larson, D.E.; Sells, B.H.** 1991. Regulation of ribosome biogenesis in differentiated rat myotubes. *Molecular and cellular biochemistry* **104**:189-194.
105. **Zhang, Y., Xiong, Y; Yarbrough, WG.** 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**:725-734.