

LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DANS LA RÉGULATION DE LA
TRANSCRIPTION DES GÈNES D'ARN RIBOSOMIQUE CHEZ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Par

Jean-François Morin

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître es sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2008



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-49549-0
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-49549-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■ ■ ■
Canada

Le 24 octobre 2008

le jury a accepté le mémoire de M. Jean-François Morin dans sa version finale.

Membres du jury

M. Benoît Leblanc
Directeur
Département de biologie

M. Luc Gaudreau
Membre
Département de biologie

M. Daniel Lafontaine
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la régulation de la structure de la chromatine sur la régulation de la transcription de classe I, nous avons étudié la distribution et le comportement de deux protéines associées à la chromatine au locus ribosomique. La première de ces protéines est Hmo1p, une protéine possédant une homologie de séquence avec le facteur UBF, un facteur de transcription de classe I présent chez les vertébrés. La seconde protéine est le variant d'histone H2A.Z, variant connu pour son implication dans la régulation de la transcription.

Nous avons initialement étudié le comportement de Hmo1p au niveau du promoteur du gène d'ARNr 35S chez la levure par empreinte à la DNaseI et conclu qu'elle n'induit pas une circularisation de l'ADN à la manière des nucléosomes, comme le fait UBF au promoteur du gène ribosomique des mammifères. Nous avons également étudié l'affinité de Hmo1p pour la séquence primaire au locus ribosomique et conclu qu'elle ne possède pas d'affinité particulière ni pour la séquence primaire du promoteur ni pour d'autres parties du locus ribosomique. Nous avons étudié la distribution de Hmo1p au locus ribosomique par immunoprécipitation de la chromatine sur des cellules en croissance active de même que sur des cellules traitées à la rapamycine. Nous avons observé un enrichissement à proximité du promoteur, mais aucune différence en fonction de l'état de croissance. Nous avons conclu que la protéine Hmo1p n'est pas impliquée dans la régulation de la transcription au niveau du promoteur d'ARNr 35S.

Nous avons ensuite analysé le comportement du variant d'histone H2A.Z par immunoprécipitation de la chromatine au niveau du locus ribosomique sur des cellules en croissance active, sur des cellules stimulées à la rapamycine et sur des cellules en phase stationnaire. Nous avons conclu que le variant d'histone est non seulement enrichi aux promoteurs du locus ribosomique, mais que cet enrichissement corrèle avec la forme euchromatique du locus ribosomique. Nous avons ensuite mesuré, d'après la quantité de

nouveaux transcrits produits, l'effet de la délétion du gène *HTZ1* sur la transcription de classe I. Cette délétion entraîne une chute d'environ 30% de la transcription du gène d'ARNr 35S. Nous concluons donc que le variant d'histone H2A.Z fait plus que corrélérer avec la forme euchromatique du locus ribosomique, mais qu'il joue effectivement un rôle dans la régulation de la transcription de classe I. Nous avons ensuite étudié le comportement du variant d'histone H2A.Z par immunoprécipitation de la chromatine au niveau des promoteurs de gènes de classe II impliqués dans la biosynthèse des ribosomes. Nous avons donc étudié le comportement du variant H2A.Z aux promoteurs de trois gènes de protéines ribosomiques (*RPS18B*, *RPS21* et *RPS22B*) sur des cellules en croissance active, des cellules traitées à la rapamycine et des cellules en phase stationnaire. Nous avons conclu que non seulement le variant d'histone H2A.Z est enrichi aux promoteurs de gènes « RP », mais que cet enrichissement corrèle avec une répression récente de la transcription. En dernier lieu, nous avons étudié l'importance de la machinerie transcriptionnelle de classe I sur les différences de « comportement » du variant H2A.Z au locus ribosomique et aux gènes « RP » dans une souche PSW. Nous avons procédé par immunoprécipitation de la chromatine associée au variant H2A.Z au niveau du locus ribosomique sur des cellules en croissance active et sur des cellules traitées à la rapamycine. Nous avons conclu que la différence de « comportement » du variant H2A.Z ne peut être attribuée à la différence de machinerie transcriptionnelle.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la bonne réussite de mes travaux. En premier lieu, je me dois de remercier le docteur Daniel Lafontaine pour ses conseils tout au long de ma maîtrise. Des remerciements chaleureux vont évidemment au docteur Luc Gaudreau ainsi qu'à toute son équipe. Le climat scientifique et la franche camaraderie dans lesquels j'ai eu la chance d'évoluer ont fait de ma maîtrise une expérience enrichissante d'un point de vue personnel et scientifique.

Il va sans dire que des remerciements particulièrement enthousiastes doivent être adressés à mon directeur de maîtrise le docteur Benoît Leblanc. Sa direction irréprochable tant sur le plan scientifique qu'humain fut appréciée au plus haut point. J'aurai retiré de ces quelques années sous sa direction non seulement une véritable formation en sciences, mais aussi et surtout un goût renouvelé pour le savoir au sens large. Plus important que tout, au-delà de la formation, je garderai d'excellents souvenirs des années passées dans son laboratoire.

Je tiens également à remercier l'Université de Sherbrooke, le FCI et le FQRNT sans qui rien de ceci n'aurait pu être possible.

Enfin, je ne saurais suffisamment remercier Sandra, ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure et de ses aléas.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	3
1.1 L'IMPORTANCE DES GÈNES RIBOSOMIQUES CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	3
1.2 NUCLÉOLE ET ORGANISATEUR NUCLÉOLAIRE.....	4
1.2.1 LES GÈNES DU LOCUS RIBOSOMIQUE CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	6
1.2.2 LA CHROMATINE RIBOSOMIQUE.....	7
1.2.3 SÉQUENCES RÉGULATRICES ET MACHINERIE.....	10
1.2.3.1 L'AMPLIFICATEUR.....	10
1.2.3.2 LE PROMOTEUR.....	12
1.2.3.3 LE TERMINATEUR.....	14
1.2.3.3.1 L'ÉLÉMENT TERMINATEUR T0 ET SA CHROMATINE.....	16
1.2.3.3.2 L'ÉLÉMENT TERMINATEUR T0 CHEZ LA LEVURE.....	19
1.2.3.4 LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE.....	21
1.2.3.4.1 LA PROTÉINE Hmo1p.....	25
1.2.3.4.2 LE PHÉNOTYPE « POLYMÉRISE SWITCH ».....	28
1.3 LES VARIANTS D'HISTONE DANS LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION.....	32
1.3.1 LE VARIANT D'HISTONE H2A.Z.....	33
1.4 RÉGULATION COORDONNÉE DE LA BIOGÉNÈSE RIBOSOMIQUE.....	37
1.4.1 LA VOIE TOR.....	37

1.5 LES TRAVAUX.....	41
CHAPITRE 2.....	43
2.1 CELLULES.....	43
2.1.1 MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS.....	44
2.1.2 PRÉCULTURES ET CULTURES.....	44
2.1.3 TRAITEMENT À LA RAPAMYCINE.....	45
2.1.4 CONDITIONS PLATEAU.....	45
2.1.5 PRÉPARATION DE LEVURES COMPÉTENTES.....	45
2.1.6 TRANSFORMATION DE LEVURES COMPÉTENTES.....	46
2.2 ANALYSE D'EXPRESSION.....	46
2.2.1 RÉCOLTE DES ARN.....	46
2.2.2 VÉRIFICATION DES ARN.....	47
2.2.3 TRANSCRIPTION INVERSE.....	47
2.3 ANALYSE D'ENRICHISSEMENT.....	47
2.3.1 IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE.....	47
2.3.2 PCR EN TEMPS RÉEL.....	49
2.4 ANALYSE DE Hmo1p.....	49
2.4.1 PURIFICATION DE Hmo1p.....	50
2.4.2 RÉACTIONS DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE - PCR.....	51
2.4.3 MARQUAGE RADIOACTIF DE SONDAS ADN.....	53
2.4.4 EMPREINTE À LA DNASE 1.....	54
2.4.5 RETARDEMENT SUR GEL.....	54
2.4.6 RÉTICULATION AU PSORALEN.....	56
2.4.6.1 RÉTICULATION.....	56
2.4.6.2 BUVARDAGE SOUTHERN.....	57
2.4.6.3 HYBRIDATION.....	57
CHAPITRE 3.....	59
3.1 Hmo1p.....	59

3.1.1 DISTRIBUTION AU LOCUS RIBOSOMIQUE.....	59
3.1.2 INTERACTION AVEC LE PROMOTEUR DU GÈNE D'ARN _r 35S.....	60
3.1.2 AFFINITÉ POUR LA SÉQUENCE PRIMAIRE DU LOCUS RIBOSOMIQUE.....	61
3.2 VARIANT D'HISTONE H2A.Z.....	63
3.2.1 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT AU LOCUS RIBOSOMIQUE	63
3.2.2 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT À CERTAINS GÈNES « RP ».....	65
3.2.3 DÉLÉTION DU VARIANT D'HISTONE H2A.Z	69
3.2.4 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT DANS UNE SOUCHE PSW.....	71
3.2.5 ASSOCIATION DIRECTE PAR RÉTICULATION AU PSORALEN.....	73
CHAPITRE 4.....	76
4.1 Hmo1p, PROTÉINE À BOÎTE HMG DE CLASSE B	76
4.2 Hmo1p, PROTÉINE COORDINATRICE.....	78
4.3 H2A.Z DANS LA BIOSYNTHESE DES RIBOSOMES	79
CONCLUSION.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNsss	ADN de sperme de saumon, sonifié et simple-brin
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
BrET	Bromure d'éthidium
CSM	Milieu synthétique complet
C-ter	Carboxy terminal
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
g	Gramme
Gène « RP »	Gène de « protéine ribosomique »
Hepes	4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthanesulfonate
Kb	Kilobase(s); millier(s) de paires de bases
IP	Immunoprécipitation
L	Litre
LB	L-broth, milieu de culture Luria-Bertani
M	Molaire
N-ter	Amino terminal
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PMSF	Phényléméthyle sulfoxyde
Pol1	ARN polymérase I
Pol2	ARN polymérase II

Pol3	ARN polymérase III
Psoralen	4,5',8-trimethylpsoralen
PSW	Changement de polymérase
qPCR	PCR quantitatif
RPM	Révolutions par minutes
RT	Transcriptase inverse
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodécyle sulfate de sodium
SB	Hydroxyde de sodium –Borate (16.7 mM de H ₃ BO ₃ , 5 mM NaOH, pH 8.4)
SSC	Solution saline au citrate (150mM de NaCl, 15mM de citrate de sodium)
TBE	Tris-Borate-EDTA (90mM de borate de Tris, 2 mM d'EDTA, pH 8.3)
TE	Tris-EDTA (10mM de tris. HCL, 1 mM d'EDTA, pH 8.3)
T.P.	Température de la pièce
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Trp	Tryptophane
TSS	Site d'initiation de la transcription
Ura	Uracile
UV	Ultra-violets
V	Volt
(v/v)	(volume/volume)
n, μ, m	Nano, micro, milli
sec, min, h	Secondes, minute, heure
cm, m	Centimètre, mètre
°C	Degré
NEB	New-England Biolabs
NFR	Région sans nucléosome

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des sous-unités de l'ARN polymérase I chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et les mammifères.....	22
Tableau 2. Liste de facteurs de transcription de l'ARN polymérase I chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et les mammifères.....	23
Tableau 3. Liste des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées.....	43
Tableau 4. Liste des amorces utilisées.....	52
Tableau 5. Conditions utilisées pour l'expérience d'empreinte à la DNaseI.....	55

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du nucléole.....	5
Figure 2. Structure du locus ribosomique.....	7
Figure 3. Fonctionnement de l'amplificateur selon le modèle.....	12
Figure 4. Activation et inactivation de la transcription via le Termineur T0.....	19
Figure 5. Machinerie transcriptionnelle selon le modèle.....	24
Figure 6. Complexes et mécanisme de Sir2p.....	30
Figure 7. Distribution de H2A.Z aux promoteurs.....	36
Figure 8. Voie TOR dans la régulation de la biogénèse des ribosomes.....	38
Figure 9. Suivi de purification de Hmo1p.....	51
Figure 10. Distribution des groupes d'amorces utilisées sur le locus ribosomique.....	52
Figure 11. Enrichissement de Hmo1p au locus ribosomique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Figure 12. Empreinte à la DnaseI de Hmo1p sur le promoteur du gène d'ARNr 35S.....	62
Figure 13. Affinité de la protéine Hmo1p selon le site au locus ribosomique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
Figure 14. Enrichissement en H2A.Z au locus ribosomique selon l'état de croissance.....	65
Figure 15. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène <i>RPS18B</i> selon l'état de croissance.....	67
Figure 16. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène <i>RPS21</i> selon l'état de croissance.....	68
Figure 17. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène <i>RPS22B</i> selon l'état de croissance.....	69
Figure 18. Mesure de la nouvelle transcription de classe I.....	70
Figure 19. Effet de la délétion du gène <i>HTZ1</i> sur la transcription de classe I.....	71
Figure 20. Enrichissement de H2A.Z aux promoteurs du locus ribosomique dans une souche PSW de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
Figure 21. Réticulation au psoralen.....	74
Figure 22. Enrichissement en H2A.Z au promoteur de <i>INO1</i> selon l'état de croissance.....	82

INTRODUCTION

On évoque souvent comme point de départ de la vie, un monde que l'on dit à l'ARN. Dans ce monde primitif, l'acide ribonucléique, par sa capacité à catalyser certaines réactions chimiques, aurait évolué vers une molécule capable en premier lieu d'autoréplication, puis finalement de nombreuses autres activités catalytiques. Cette forme de vie primitive serait le point de départ vers la vie sous sa forme actuelle (Gilbert, 1986). Dans la forme « moderne » sous laquelle nous retrouvons actuellement la vie, l'acide ribonucléique et l'acide désoxyribonucléique se partagent le rôle de support de l'information génétique, alors que le rôle de catalyseur a été surtout relégué aux protéines. Bien que la plupart des réactions soient aujourd'hui catalysées par des protéines, il existe toujours quelques cas où l'ARN conserve un rôle catalytique important. Le ribosome, véritable usine à protéines de la cellule, en est l'exemple le plus important.

Afin de pouvoir répondre rapidement à ses besoins ainsi qu'aux changements du milieu, la cellule en croissance possède beaucoup plus de ribosomes qu'elle ne contient de transcrits. La charge énergétique de la synthèse des ribosomes est donc très lourde. Tout mécanisme représentant une charge énergétique élevée pour le métabolisme nécessite une régulation fine afin d'éviter de gaspiller les ressources de la cellule, de façon à ce que celle-ci demeure compétitive. La synthèse des ribosomes n'y fait pas exception.

Compte tenu de l'ampleur du génome, son confinement au noyau chez les eucaryotes nécessite un niveau élevé de compaction du matériel génétique. Même si on a longtemps sous-estimé l'impact de cette compaction physique sur l'accessibilité à l'information génétique, on réalise aujourd'hui la grande importance de bien comprendre ce phénomène et sa régulation. La biosynthèse des ribosomes implique beaucoup d'activités transcriptionnelles. Elle ne fait donc pas exception ici non plus et se voit également affectée par cette compaction du matériel génétique.

La pièce maîtresse de l'activité catalytique des ribosomes est un transcrit hautement exprimé. Ce transcrit est issu d'un gène répété en tandem à plusieurs dizaines de reprises et dont les différents états transcriptionnels, actif ou inactif, sont respectivement associés à une chromatine ouverte et accessible ou encore dense et inaccessible. Ce gène particulier, connu chez *Saccharomyces cerevisiae* comme le gène d'ARN ribosomique 35S, a en plus la particularité de voir cohabiter des copies sous leurs deux états chromatinien distincts dans une même cellule en croissance. Cette particularité fait du locus ribosomique un cas d'intérêt exceptionnel pour étudier l'impact de la structure de la chromatine sur la transcription. Qui plus est, l'étude de la régulation de la biosynthèse des ribosomes possède également un intérêt thérapeutique puisque nous la savons régulée, entre autres, par des suppresseurs de tumeur bien connus comme les protéines RB et p53.

C'est donc l'étude de l'aspect chromatinien de la régulation de la transcription des gènes d'ARN ribosomique qui est au centre de mon projet de recherche. De façon plus précise, nous nous intéressons à la différence chromatinienne entre les gènes transcriptionnellement actifs et inactifs au locus ribosomique.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 L'IMPORTANCE DES GÈNES RIBOSOMIQUES CHEZ *S. CEREVISIAE*

Les cellules eucaryotes en croissance ont des besoins très importants en protéines. Pour répondre à ses imposants besoins, la cellule doit posséder un très grand nombre de ribosomes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, on estime leur nombre à environ 200 000 par cellule (Warner et al., 2001), cela représente donc une production d'environ 2000 ribosomes par minute en fonction du temps de division de la cellule.

La synthèse des ribosomes a la particularité d'impliquer les trois ARN polymérases de la cellule. Pour sa part, l'ARN polymérase I est exclusivement dédiée à la transcription du gène d'ARN ribosomique 35S, alors que l'ARN polymérase III transcrit le gène d'ARNr 5S (Moss, 2004). De son côté, l'ARN polymérase II se voit confier la transcription des 138 gènes formant les 79 protéines ribosomiques (Link et al., 1999; Planta et Mager, 1998).

Une cellule en pleine croissance contient jusqu'à 50 fois plus d'ARN que d'ADN. De cet ARN, 80% est ribosomique, 15 % est représenté par les ARN de transfert et seulement 5% par les ARN messagers (Warner et al., 2001). Considérant que les gènes d'ARNr 5S et 35S sont répétés en tandem entre 100 et 150 reprises (Schweizer et al., 1969), on comprend aisément la lourdeur de la charge que leur transcription fait peser sur le métabolisme. En fait, il a été noté qu'à elle seule la transcription du gène d'ARNr 35S par l'ARN pol I correspond à plus de 60% de la transcription totale d'une cellule en croissance rapide (Warner, 1989).

Tant pour des raisons stoechiométriques qu'à cause de la relativement courte demie vie de leurs ARNm (Li et al., 1999), les gènes des protéines ribosomiques sont parmi gènes les plus transcrits par l'ARN polymérase II. Un excellent article de (Velculescu et al., 1997) signale

d'ailleurs que vingt des trente ARNm les plus fortement exprimés chez une cellule en croissance rapide codent pour des protéines ribosomiques. La transcription des gènes de protéines ribosomiques représente donc près de la moitié de la transcription effectuée par l'ARN polymérase II. Il ne faut pas non plus négliger les quelques 150 protéines non ribosomiques impliquées dans la maturation des ribosomes ainsi que dans l'importation et l'exportation nucléaire des composants du ribosome (Granneman et Baserga, 2004).

Au point de vue énergétique, la biogenèse des ribosomes consomme donc la part du lion de l'énergie de la cellule. Avec une telle consommation de ressources, la question récemment soulevée par le groupe de Tom Moss (Moss et al., 2007) prend toute son importance. La synthèse des ribosomes n'est-elle qu'un coûteux mécanisme de maintien ou alors contrôle-t-elle littéralement la croissance de la cellule? Malgré de grands progrès réalisés récemment dans ce domaine, nous n'avons toujours pas de réponse claire à cette question. Nous verrons par contre dans les pages qui suivent, via notamment les travaux du groupe de Michel Riva, qu'il existe plusieurs indices sérieux suggérant un rôle allant au-delà du simple mécanisme d'entretien.

1.2 NUCLÉOLE ET ORGANISATEUR NUCLÉOLAIRE

Le nucléole, structure non compartimentée que l'on retrouve dans le noyau des cellules eucaryotes, est l'organite où sont produits les ribosomes (figure 1). Cette structure sans paroi ni membrane est le résultat de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I, ainsi que de la maturation de transcrits formant le ribosome. La présence et la localisation du nucléole sont directement associées à la transcription au locus ribosomique.

Bien qu'il varie significativement dans sa séquence et sa structure d'un modèle à l'autre (figure 2), le locus ribosomique demeure toujours la base autour de laquelle s'articule la synthèse des ribosomes (Raska et al., 2006). Il est toujours formé selon le même plan : plusieurs dizaines de copies en tandem d'un gène et de son espace intergénique (Mougey et al., 1993; Osheim et al., 1996; Pikaard et al., 1990). La nomenclature utilisée pour nommer

ce gène ainsi répété change selon le modèle utilisé. Pour des raisons de simplicité, nous y référerons donc comme le «gène ribosomique» (Reeder, 1999).

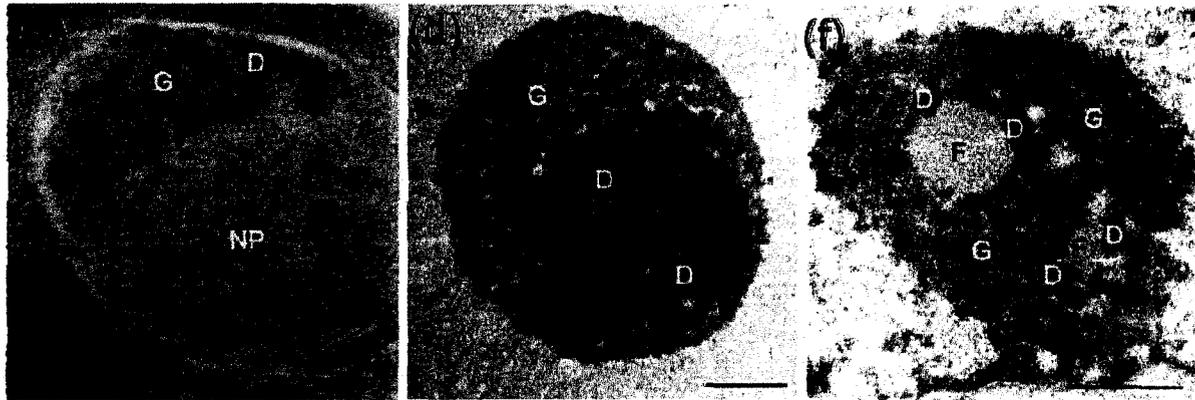


Figure 1. Structure du nucléole (Tiré de Raska I 2006). Images de microscopie électronique d'un nucléole de a) *Saccharomyces cerevisiae*, d) *Xenopus laevis* et f) *Mus musculus*. G : composant granulaire, F : centre fibrillaire, D : composant fibrillaire dense, NP : nucléoplasme.

Chez la majorité des espèces, à la différence de ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, toutes les copies du gène ribosomique ne sont pas réunies en un seul et même site du génome (Nomura, 2001). Ceci a pour effet d'entraîner la formation de plusieurs nucléoles. Il a même été démontré qu'en intégrant une copie du gène ribosomique ailleurs dans le génome (Oakes et al., 2006a), ou encore dans un plasmide (Nierras et al., 1997), ce dernier continue à jouer le rôle d'organisateur nucléolaire. Il suffit donc d'avoir une seule copie du gène ribosomique pour organiser un nucléole fonctionnel. La présence d'une alternance des deux types de chromatine ou des séquences qui flanquent le locus ribosomique ne semble pas nécessaire à la formation du nucléole. L'expression du gène ribosomique par l'ARN polymérase I, de même que la corégulation avec la transcription des gènes de protéines ribosomiques se font également sous de telles conditions (Karpen et al., 1988).

Selon un article récent du groupe de Masayasu Nomura, peu importe le site dans le génome, la transcription ectopique du gène ribosomique possède exactement les mêmes caractéristiques que dans une souche ne contenant que des copies transcriptionnellement

actives (Karpen et al., 1988; Oakes et al., 2006a). Selon le même article, l'organisation en tandem du locus ribosomique n'est pas nécessaire pour avoir une transcription optimale du gène ribosomique. Notons par contre que d'autres équipes de renom soutiennent que cette organisation en tandem est importante à cause du lien existant entre la terminaison de la transcription et son initiation (Morrow et al., 1989; Moss et Stefanovsky, 1995; Nemeth et al., 2004).

1.2.1 LES GÈNES DU LOCUS RIBOSOMIQUE CHEZ *S.CEREVISIAE*

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la transcription du gène ribosomique par l'ARN polymérase I produit le transcrit immature d'ARNr 35S. Chez *Xenopus laevis* le transcrit immature du même gène est connu comme 40S, alors qu'on le nomme ARNr 47S chez l'humain. Chez *S. cerevisiae*, la maturation de ce transcrit engendre respectivement les ARNr 18S, 5.8S et 25S. À ce niveau, le résultat est le même chez l'homme comme chez *Xenopus laevis*, sauf que le fragment d'ARNr 28S remplace le 25S (Goldman et al., 1983; Moss et al., 2007; Warner, 1989). Ces fragments d'ARNr représentent trois des quatre fragments à la base de l'activité catalytique du ribosome. Le quatrième fragment d'ARNr est issu de la transcription, par l'ARN polymérase III, du gène d'ARNr 5S (Perry, 1981).

De façon générale, le gène d'ARNr 5S n'est pas situé au locus ribosomique, mais ailleurs dans le génome, voire même sur un autre chromosome (Long et Dawid, 1980). À cet égard, la levure fait figure d'exception puisque chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce gène est présent dans l'espace intergénique. Notons que son orientation est l'inverse de celle du gène ribosomique (Srivastava et Schlessinger, 1991). Notons également que, chez *S. cerevisiae*, bien que le gène d'ARNr 5S soit transcrit au niveau du nucléole, sa transcription n'est pas plus responsable de la formation de ce dernier que chez les autres modèles.

L'espace intergénique, tout comme les séquences codantes du locus ribosomique, joue un rôle capital dans la synthèse des ribosomes et leur régulation. Cet espace, qui comme son

nom l'indique sépare chaque gène ribosomique de la copie suivante, est richement pourvu de séquences régulatrices. On y retrouve entre autres des éléments promoteurs, des séquences de terminaison et d'amplification de même que les origines de réplication (Reeder, 1984). Nous traiterons plus en détails de ces éléments à la section 1.2.3.

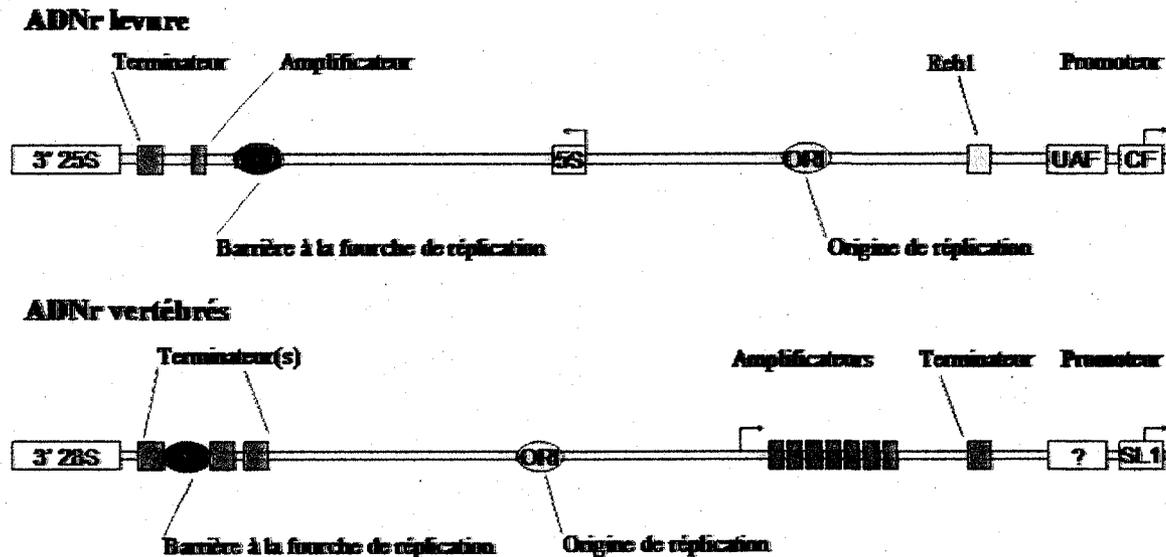


Figure 2. Structure du locus ribosomique (Adapté de Reeder R 1999). L'organisation du locus ribosomique varie légèrement de la levure aux vertébrés.

1.2.2 LA CHROMATINE RIBOSOMIQUE

Tel que mentionné précédemment, en raison de ses dimensions, même le plus petit des génomes eucaryotes doit être compacté pour être contenu dans le noyau d'une cellule. L'ADN est donc empaqueté sous forme de nucléosomes selon le modèle du « collier de perles ». Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, est en fait un octamère de protéines autour duquel s'enroule l'ADN. L'ADN double brin s'enroule autour de l'octamère sur environ 146 pb en effectuant 1,65 fois le tour de ce dernier (Finch et al., 1975; Kornberg et Lorch, 1992; Luger et al., 1997). Une séquence d'environ 50pb fait le lien avec le nucléosome suivant. L'octamère est formé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Kornberg et Thomas, 1974). L'histone H1 se lie au niveau de la séquence de

liaison avec le prochain nucléosome (Noll, 1978). L'organisation du matériel génétique sous forme de nucléosomes porte le nom de chromatine. La structure de la chromatine a évidemment un impact sur l'accessibilité à l'information génétique. Il en est de même au niveau du locus ribosomique.

Un élément important du locus ribosomique, commun aux mammifères et à la levure, fut découvert dans le laboratoire du docteur José Sogo à Zurich. Ces travaux réalisés par Antonio Conconi, Reinhard Dammann, Renzo Lucchini et Theodor Koller ont fait les premiers pas dans l'étude de la chromatine au niveau du locus ribosomique. Ce groupe fut le premier à utiliser la réticulation au psoralen de l'ADN pour étudier la chromatine ribosomique (Conconi et al., 1984; Lucchini et al., 1987). L'utilisation du psoralen comme agent de pontage fut révolutionnaire au sens où cette technique a permis de démontrer directement l'existence de deux populations chromatiniennes distinctes parmi les séquences codantes du locus ribosomique (Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1993). Un premier état est ouvert et facilement accessible tant pour la machinerie transcriptionnelle que pour la réticulation. Le second état est beaucoup plus difficile d'accès pour la transcription ou la réticulation au psoralen. Après réticulation au psoralen on peut séparer ces deux états chromatiniens par électrophorèse.

La chromatine ribosomique est retrouvée uniquement sous ces deux états, car il n'existe pas d'état chromatinienn intermédiaire au locus ribosomique (Osheim et al., 1996). Les travaux de José Sogo ont également démontré que la présence d'une copie transcriptionnellement active a un effet sur l'état chromatinienn de la copie suivante. Malgré tout, les deux états chromatiniens sont distribués de façon à peu près uniforme sur toute la longueur de l'organisateur nucléolaire. Il n'y a donc pas formation d'amas de copies transcriptionnellement actives ou inactives, mais on sait que la chromatine au niveau de l'amplificateur sera sous le même état que la copie précédente (Dammann et al., 1995). Précisons également, même si cela peut sembler contre-intuitif, que les copies transcriptionnellement actives conservent quand même une organisation nucléosomale (Jones

et al., 2007; Tongaonkar et al., 2005). Il semble que l'état chromatinien d'une copie ne soit pas conservé et transmis à la génération suivante, mais plutôt que les copies transcriptionnellement actives sont déterminées aléatoirement à chaque division (Dammann et al., 1995).

Avant ces travaux, même si nous connaissions l'existence des nombreuses copies en tandem du gène ribosomique (Petes, 1979), il n'y avait toujours pas de consensus sur l'état de la chromatine ribosomique. Les travaux de Jonathan Warner sur la synthèse des ribosomes avaient déjà clairement indiqué que leur production est très réduite quand les cellules ne se trouvent plus en conditions de croissance (Kief et Warner, 1981; Waldron et Lacroute, 1975). Les travaux de Sogo et Smith ont donc découvert que les levures modulent le nombre de copies transcriptionnellement actives pour réguler la synthèse des ribosomes (Dammann et al., 1993). Cette régulation du taux de copies transcriptionnellement actives se fait par l'enzyme Rpd3, une histone déacétylase, qui permettra d'éteindre des copies actives (French et al., 2003; Sandmeier et al., 2002). Notons par contre qu'il ne s'agit que d'une des principales méthodes utilisées par la cellule pour réguler cette transcription, car en absence de Rpd3 la cellule compensera en faisant varier la quantité d'ARN polymérase I chargée par copie transcrite (Sandmeier et al., 2002). Il s'agit là des premiers indices impliquant directement des modifications apportées à la structure de la chromatine pour réguler la transcription des gènes d'ARN ribosomique. On a longtemps cru que cette variation du taux de copies actives se faisaient également chez les mammifères, quoi que de façon beaucoup moins spectaculaire que chez la levure (Conconi et al., 1989). Il a par contre été publié récemment que ce mécanisme ne semble pas conservé chez les mammifères (Stefanovsky et Moss, 2006). Néanmoins, on observe une variation du taux de copies transcriptionnellement ouvertes chez les mammifères, sans toutefois pouvoir y associer une augmentation correspondante de la transcription (Moss et al., 2007).

1.2.3 SÉQUENCES RÉGULATRICES ET MACHINERIE

Tel que mentionné précédemment la séquence séparant les gènes au niveau du locus ribosomique contient de nombreuses séquences régulatrices. Nous savons que selon le modèle étudié, il existe de nombreuses différences non seulement dans la séquence et la structure de ces éléments (Goldman et al., 1983), mais également dans la machinerie impliquée dans les différents processus moléculaires qui y sont associés. Nous ferons donc un rapide survol de certains de ces éléments régulateurs et des mécanismes qui y sont associés. Afin de se faire une idée plus globale, nous comparerons toujours les cellules vertébrées avec *Saccharomyces cerevisiae*. Les vertébrés constituent un vaste groupe qui varie passablement d'un organisme à l'autre. Dans ce contexte, nous regardons essentiellement *Xenopus laevis* comme le paradigme que l'on décline de la souris à l'être humain (Pikaard et al., 1990).

1.2.3.1 L'AMPLIFICATEUR

L'amplificateur se définit comme une séquence d'ADN insuffisante pour servir de promoteur, mais suffisante pour entraîner une augmentation du niveau de transcription d'un gène.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, tel que représenté à la figure 2, l'amplificateur est situé dans la séquence intergénique, plus de 2 Kb en amont du gène d'ARNr 35S (Elion et Warner, 1984). Il s'agit d'une séquence non répétée, d'environ 300 pb, formée de deux éléments stimulant distinctement la transcription. Cette séquence est située environ 100 pb en aval de la copie précédente, à quelques nucléotides seulement de la séquence de liaison de Reb1p (Schultz et al., 1993). La séquence amplificatrice entraîne une augmentation du niveau de transcription du gène ribosomique de 15 à 30 fois, mais est moins dépendante de l'orientation que ce que l'on observe chez les autres modèles (Elion et Warner, 1984; Elion et Warner, 1986). Le fait que l'amplificateur et la séquence de liaison de Reb1p ne soient séparés que de

quelques nucléotides a fait couler beaucoup d'encre (Morrow et al., 1989). Existe t-il un lien entre la terminaison de la transcription et l'effet de la séquence amplificatrice? Les travaux d'Ingrid Grummt et de Brian McStay ont révélé, chez l'homme, un lien entre l'initiation et la terminaison de la transcription du gène ribosomique (McStay et Reeder, 1990; Nemeth et al., 2004). Toutefois, on n'a toujours pas découvert de lien direct entre la terminaison de la transcription à proximité du site de liaison de Reb1p (Reeder et al., 1999) et la séquence amplificatrice chez la levure. Certains évoquent la possibilité d'un lien physique entre la machinerie de terminaison et les éléments liant la séquence amplificatrice via Reb1p (Johnson et Warner, 1989; Kulkens et al., 1992), mais, à ce jour, rien n'a encore été publié en ce sens.

Chez *Xenopus laevis*, l'amplificateur est situé en amont du promoteur de la copie affectée, plutôt que directement en 5' de la copie précédente comme chez *Saccharomyces cerevisiae* (voir figure 2). La séquence amplificatrice est ici formée d'une courte séquence de l'espace intergénique répétée à plusieurs reprises. Cette séquence de 60 pb est parfois précédée d'une autre séquence de 21 pb, ce qui lui confère son nom d'amplificateur 60/81. On retrouve un petit nombre de promoteurs intergéniques, un autre élément qui contribue à l'amplification de l'expression du gène ribosomique, inséré parmi les répétitions d'éléments 60/81 de l'amplificateur. Le promoteur intergénique n'est en fait qu'une autre copie d'un promoteur de classe I en amont du gène. Il a probablement pour rôle d'attirer davantage d'ARN polymérase I à proximité du gène ribosomique (De Winter et Moss, 1987; Pikaard et Reeder, 1988). Comme nous le verrons plus loin, la présence de promoteurs intergéniques au niveau de l'amplificateur entraîne la nécessité d'avoir une séquence terminatrice juste en aval du promoteur. Notons qu'il n'y a pas de promoteur intergénique chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Plus étonnant que l'importante variation dans la structure de la séquence amplificatrice, est la différence dans les mécanismes par lesquels la séquence amplificatrice exerce son effet sur la transcription au locus ribosomique. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la séquence

amplificatrice affecte le niveau de transcription du gène ribosomique en augmentant le taux de réinitiation de la transcription des copies actives (Banditt et al., 1999). À l'opposé, chez *Xenopus laevis*, l'amplificateur affecte le niveau de transcription en facilitant la formation de complexe de préinitiation. Cette stabilisation a pour conséquence directe d'entraîner l'activation d'un plus grand nombre de copies du gène ribosomique (Osheim et al., 1996).

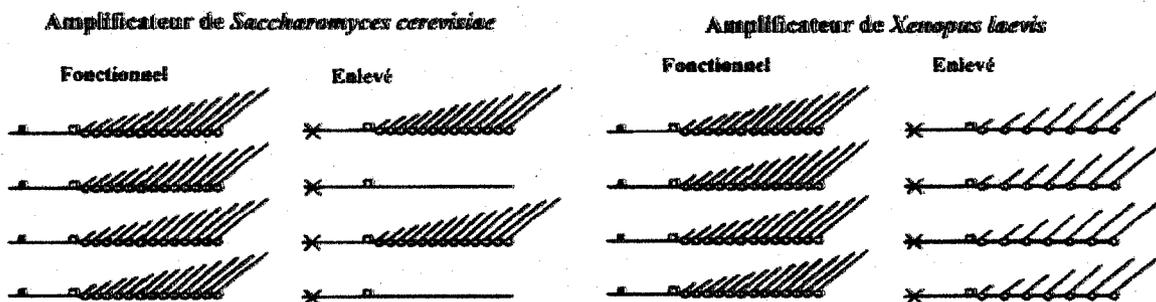


Figure 3. Fonctionnement de l'amplificateur selon le modèle (Adapté de Banditt M 1999). De la levure aux vertébrés, la séquence amplificatrice varie dans son organisation, sa disposition, mais aussi et surtout dans le mécanisme par lequel elle agit sur le niveau de transcription ribosomique. Chez la levure, la séquence amplificatrice favorise la réinitiation de la transcription des copies actives, alors que chez les vertébrés elle facilite la formation du complexe de préinitiation.

1.2.3.2 LE PROMOTEUR

Le promoteur se définit comme une séquence d'ADN généralement située en amont du site d'initiation de la transcription et qui joue le rôle d'élément contrôlant la transcription du gène.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, on publia dès 1989 un article où l'on définit avec plus de précision la structure du promoteur du gène d'ARNr 35S (Musters et al., 1989). On identifia initialement trois domaines impliqués dans la régulation de la transcription. Le premier domaine, qui s'étend de 28 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription à 8 nucléotides en aval de ce dernier (-28 à +8), est nécessaire à la transcription en contexte *in vitro*. On nomme ce domaine « CORE ». C'est l'élément proximal du promoteur. Le second domaine s'étend de 51 à 70 nucléotides (-51 à -70) en amont du TSS, alors que le troisième

va pour sa part de 76 à 146 nucléotides (-76 à -146) en amont du même site. Ces deux derniers domaines, quoi qu'ayant un effet important sur le niveau de transcription *in vitro*, n'y sont pas essentiels.

Avec du recul, on a conceptuellement réuni ces deux derniers domaines en une structure que l'on nomme « Upstream Element », c'est l'élément distal du promoteur (Moss et al., 2007). À ce jour, les frontières précises de ces éléments sont restées à peu près inchangées (Keener et al., 1998). On a également réalisé que l'espacement entre le CORE et le Upstream Element est très important. Une variation de cet espacement entraîne une forte réduction de la stimulation de la transcription par l'élément distal (Choe et al., 1992). On interprète cela comme étant dû au fait que les facteurs se liant à ces deux éléments du promoteur nécessitent d'être situés du même côté de la double hélice d'ADN.

Chez l'être humain, le promoteur du gène ribosomique 47S a été étudié à partir de 1986 (Haltiner et al., 1986). Contrairement à certains aspects de la transcription ribosomique, la structure du promoteur est bien conservée de l'être humain à la levure. En effet, tout comme chez la levure, on a identifié deux domaines de régulation de la transcription. Un premier domaine, que l'on nomme également « CORE » ou promoteur proximal, s'étend de 45 nucléotides en amont du TSS à 18 nucléotides (-45 à +18) en aval. Cet élément est également le seul à être essentiel à la transcription *in vitro*. Le second domaine est ici nommé « Upstream Control Element » ou promoteur distal, il s'étend de 107 à 156 nucléotides (-107 à -156) en amont du TSS. Tout comme son équivalent chez la levure, il est utile sans être nécessaire à la transcription *in vitro*. On note également chez l'être humain qu'une variation de l'espacement entre le promoteur proximal et distal entraîne une importante réduction du niveau de transcription.

La façon dont le promoteur et ses acteurs se mettent en scène pour initier la transcription du gène ribosomique est évoquée à la section 1.2.3.4.

1.2.3.3 LE TERMINATEUR

Le terminateur se définit comme la séquence d'ADN minimale nécessaire pour induire l'arrêt de la transcription et libérer l'ARN qui en est issu. Comme nous allons le voir dans les quelques lignes qui suivent, le terminateur est remarquablement conservé d'un organisme à l'autre.

Bien qu'on s'intéresse depuis longtemps à la terminaison de la transcription de classe I (van der Sande et al., 1989), il faut attendre les années 90 avant d'avoir un consensus en ce domaine chez la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le principal élément terminateur est situé 93 nucléotides en aval (+93) de la partie 3' de l'ARNr 25S mature (Reeder et al., 1999). Cet élément terminateur est composé d'une première séquence d'une quinzaine de nucléotides, 5'-TTTTATTTGTCTT-3', très riche en thymine (Lang et Reeder, 1995). Une dizaine de nucléotides en aval, on trouve le site de liaison de la protéine Reb1p, 5'-CCGGGTAAAA-3' (Lang et Reeder, 1995; Reeder et al., 1999). Cette protéine est essentielle à la terminaison de la transcription. Une fois liée à sa séquence, Reb1p amène l'ARN polymérase I à faire une pause. Une fois arrêtée, un facteur inconnu associé à la polymérase interagit avec la séquence riche en thymine et la protéine Reb1p, permettant de dissocier le transcrit naissant (Prescott et al., 2004). Ce premier élément terminateur est responsable d'arrêter la transcription de plus de 90% des transcrits (Reeder et al., 1999).

Il y a un second élément terminateur situé 250 nucléotides en aval (+250) de la partie 3' de l'ARNr 25S mature. Contrairement à l'élément terminateur principal, celui-ci ne contient pas site de liaison pour la protéine Reb1, seulement une longue séquence très riche en thymine. Son effet terminateur demeure néanmoins suffisamment puissant pour qu'aucune ARN polymérase I ne réussisse à le traverser. Il semble que son rôle soit d'arrêter les quelques ARN polymérases qui ont réussi à « survivre » au premier terminateur. On le nomme d'ailleurs « Failsafe terminator » ou terminateur de la dernière chance (Reeder et al., 1999). Malheureusement, on n'en connaît pas davantage sur son fonctionnement.

Chez les vertébrés, l'organisation du terminateur est très semblable. Tant chez la souris que chez *Xenopus laevis*, nous retrouvons sensiblement le même mécanisme de terminaison que chez la levure. Par exemple, dans le modèle murin, nous retrouvons la même organisation avec deux éléments en *trans* et deux éléments en *cis*. Toutefois, au lieu de la séquence de liaison de la protéine Reb1p, nous retrouvons une séquence de 18 acides nucléiques nommée boîte *SaII*, 5'-AGGTCGACCAGATTANTCCG-3' (Grummt et al., 1985). On retrouve dix boîtes *SaII* dans l'espace intergénique de la souris, dont neuf sont situées dans le premier Kb suivant la fin de la séquence codante du gène d'ARNr 28S. Cette séquence sert de site de liaison à la protéine TTF-I (Evers et al., 1995). Une fois sur sa séquence de liaison, la protéine TTF-I permet d'arrêter l'ARN polymérase I en transcription (Mason et al., 1997). Précisons, que tout comme c'est le cas pour la Reb1p, la fonctionnalité de la liaison de cette protéine et de sa séquence est dépendante de son orientation (Kuhn et al., 1990). L'arrêt de la polymérase par TTF-I n'est toutefois pas suffisant pour relâcher l'ARN polymérase et son transcrit de l'ADN. Bien que cela puisse sembler paradoxal, on sait que le facteur TTF-I joue également un rôle dans l'activation de la transcription.

En plus des boîtes *SaII*, on retrouve, légèrement en amont de chacune de ces boîtes, une séquence de dix à douze nucléotides (Grummt et al., 1985). Cette séquence, riche en thymine, à l'image de ce qu'on observe chez la levure, est la séquence de liaison de la protéine PTRF (Jansa et al., 1998). Cette protéine, qui interagit tant avec l'ARN polymérase I qu'avec TTF-I, permet de relâcher l'ARN polymérase et son transcrit de l'ADN. Lorsque tous ces éléments sont présents, la terminaison de la transcription se fait 565 nucléotides en aval (+565) de la partie 3' de l'ARNr 28S mature, soit au niveau de la séquence riche en thymine de la première boîte *SaII* (Mason et al., 1997).

La similitude entre ces modèles ne s'arrête pas là. En effet, tant chez *Xenopus laevis*, chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez la souris, on retrouve une autre copie du terminateur située à proximité en amont du promoteur du gène ribosomique (Moss et al., 2007). La liaison de sa protéine de liaison (Rib2, Reb1p ou TTF-I) à cet élément terminateur

supplémentaire entraîne un effet positif sur le niveau de transcription du gène ribosomique dans tous les modèles (Langst et al., 1998). On a longtemps expliqué cet effet positif sur la transcription par deux modèles. Le premier modèle, dit d'occlusion du promoteur, s'explique simplement par le fait qu'une ARN polymérase viendrait perturber un éventuel complexe de préinitiation en arrivant au niveau du promoteur. Ce modèle, bien que ne pouvant être exclu, ne peut expliquer le besoin d'une disposition précise du terminateur tel qu'observé chez *Xenopus laevis* (McStay et Reeder, 1990). Pour expliquer cette observation on a recours au second modèle, dit de stimulation du promoteur (De Winter et Moss, 1986; Mitchelson et Moss, 1987; Moss et al., 1992). Ce modèle repose sur le fait que si l'on déplace le terminateur de quelques bases, on perd son effet positif sur le niveau de transcription. Par contre, si l'on le déplace le terminateur par multiples de dix nucléotides, on réussit à récupérer une partie de son effet. La ou les protéine(s) liée(s) au terminateur doit(vent) toujours être du même côté de l'hélice d'ADN (McStay et Reeder, 1990). Ceci suggère qu'une interaction de protéines associées à la séquence terminatrice avec la machinerie présente au promoteur stimule la transcription à ce promoteur.

1.2.3.3.1 L'ÉLÉMENT TERMINATEUR T₀ ET SA CHROMATINE

Récemment, les travaux du groupe d'Ingrid Grummt portant sur cet élément terminateur à proximité du promoteur (T₀), ont jeté un regard nouveau sur la transcription ribosomique. Ces travaux mettent au premier plan des aspects jusque là négligés dans l'étude de la transcription de classe I : le remodelage de la chromatine et les modifications post-traductionnelles des histones.

Dans un premier article qui paraît en 1998, l'équipe d'Ingrid Grummt signale que la liaison du facteur TTF-I à la séquence terminatrice T₀ est nécessaire à la transcription de classe I. Cette liaison entraîne également un remodelage de la structure de la chromatine au niveau du promoteur (Langst et al., 1998). De plus, on remarque que ce remodelage de la chromatine requiert la présence de cofacteurs cellulaires toujours inconnus à l'époque.

Dans les huit années qui vont suivre, ce groupe publiera plus d'une dizaine d'articles à ce sujet. Ces nombreux articles nous indiquent qu'un nouveau complexe nommé NoRC, pour «Nucleolar Remodeling Complex», interagit avec la protéine TTF-I chez la souris (Strohner et al., 2001). Ce complexe de remodelage de la chromatine est formé de seulement deux sous-unités. Il est très semblable à d'autres complexes de remodelage comme ACF et WSTF, que l'on retrouve chez les mammifères. Tous ces complexes ont la protéine SNF2 comme cœur catalytique. SNF2 est la protéine archétype de la famille Snf2, c'est donc une ATPase dépendante de la présence de nucléosomes et elle joue le rôle de moteur dans le remodelage de la chromatine. La seconde et principale sous-unité est Tip5. Tip5 une protéine de 205 KDa qui possède une forte homologie avec notamment les protéines ACF1 et WSTF. Presque tous les domaines impliqués dans l'activité de Tip5 sont également présents chez ces autres protéines (Grummt et Pikaard, 2003).

Lorsque laissé à lui-même, le domaine de régulation négative (NRD) de TTF-I situé dans la partie N-ter, a tendance à se replier sur le domaine de liaison à l'ADN de la protéine. Ceci a pour effet de réduire la capacité de TTF-I à se lier à l'élément terminateur T0. Toutefois, lorsqu'en présence du complexe NoRC, la sous-unité Tip5 vient se lier au NRD, permettant ainsi la liaison de tout le complexe au niveau du terminateur T0 (Nemeth et al., 2004). Une fois le complexe NoRC lié au niveau de l'élément T0, la partie C-ter de la sous-unité Tip5 recrute le complexe Sin3. La liaison de ce complexe au niveau du promoteur entraîne une joyeuse cascade de modifications de la structure de la chromatine (Santoro et Grummt, 2005). Cette cascade de modifications mène ultimement à la mise en sourdine de la transcription, si bien que la surexpression de Tip5 est suffisante pour induire une importante réduction de la transcription de classe I.

Il faut attendre en 2005 pour que le groupe de Grummt détermine avec précision en quoi consiste cette cascade de modifications (Santoro et Grummt, 2005). Comme mentionné ci-dessus, suite à la liaison de TTF-I au complexe NoRC, ceux-ci vont se lier au niveau de l'élément T0 et recruter Sin3 via Tip5. En premier lieu, Sin3, par sa sous-unité HDAC1,

commence par entraîner la désacétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur. Cette modification de la chromatine permet ensuite à la SNF2 d'amorcer le déplacement de nucléosomes au niveau du promoteur. Cette réorganisation des nucléosomes permet ensuite aux ADN méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3 d'entrer en action. Elles vont méthyler les îlots CpG à 133 et 143 nucléotides en amont du TSS. Cette méthylation de l'ADN va empêcher la liaison de la protéine UBF en plus de servir de signal qui va entraîner la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 à ce niveau (voir figure 4).

Bien qu'un article récent de Masayasu Nomura contredise cet aspect (Oakes et al., 2006a), la conservation de l'organisation en tandem des gènes ribosomiques d'une espèce à l'autre suggère un rôle important de cette organisation. Un élément qui pourrait d'ailleurs contribuer à expliquer la conservation de cette organisation est le rôle paradoxal du facteur TTF-I dans l'activation de la transcription. Bien que ce phénomène ait été le sujet de nombreux articles, se contredisant parfois, du groupe d'Ingrid Grummt au cours des années 1990, son mécanisme précis demeure inconnu. Un article récent de ce même groupe propose toutefois un modèle très plausible (voir figure 4). On suggère que pour pouvoir se lier au terminateur T0, TTF-I interagisse avec un facteur inconnu. Une fois lié à l'élément terminateur, ce facteur inconnu recrute ensuite un complexe de remodelage de la chromatine semblable à NoRC qui disposera les nucléosomes de façon à favoriser la transcription. Cette nouvelle disposition des nucléosomes permet ensuite l'entrée en scène d'histone acétyltransférases (HAT) qui viendront stabiliser la chromatine sous une forme compatible à la transcription (Santoro et Grummt, 2005).

Ces travaux nous ont jusque là démontré l'importance du remodelage et des modifications post-traductionnelles de la chromatine. En 2006, paraît un dernier article du même groupe à ce sujet (Li et al., 2006b). Cet article fait un constat étonnant sur le positionnement des nucléosomes au promoteur. Non seulement ce positionnement est important sur la transcription de classe I, mais on fait même une corrélation très étroite entre la position du

nucléosome au niveau du promoteur et la présence d'activité transcriptionnelle au gène qui y est associé.

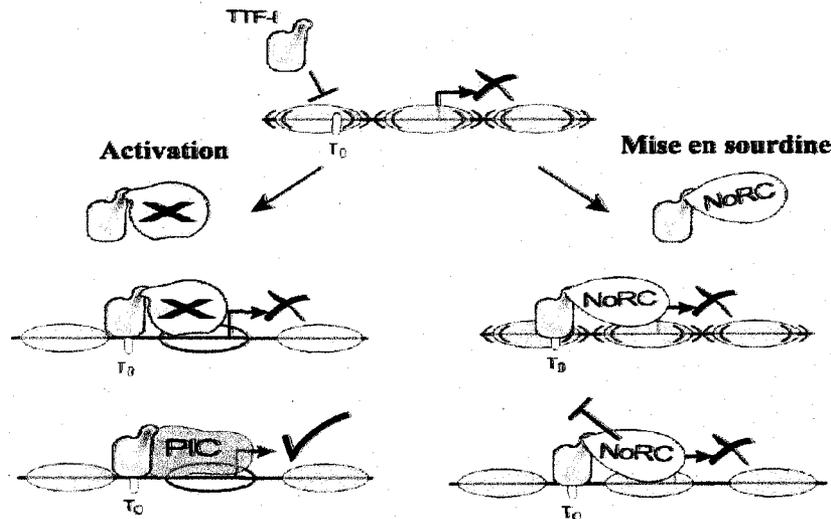


Figure 4. Activation et inactivation de la transcription via le Terminateur T0 (Adapté de Németh A 2004). Laisse à lui-même, le domaine de régulation négatif (NRD) du facteur TTF-1 empêche la liaison de l'élément T0 de l'espace intergénique. La liaison du complexe NoRC au NRD par la sous-unité Tip5 permet ensuite la liaison à l'élément T0. Cette liaison entraîne le recrutement du complexe Sin3 et sa sous-unité HDAC1 qui amorce ensuite la désacétylation locale de résidus de l'histone H4. Cette désacétylation permet à la sous-unité Snf2 d'amorcer le déplacement de nucléosomes au niveau du promoteur et finalement aux méthyltransférases Dnmt1 et 3 de venir méthyliser les îlots CpG -133 et -144, empêchant ainsi l'activation par UBF. Paradoxalement, la liaison d'un facteur inconnu au domaine NRD de TTF-1 semble permettre une activation de la transcription ribosomique. Une fois lié à TTF-1, ce facteur inconnu entraîne le recrutement d'un complexe de remodelage établissant une chromatine favorable à la transcription ensuite stabilisée par l'action de HAT.

1.2.3.3.2 L'ÉLÉMENT TERMINATEUR T0 CHEZ LA LEVURE

Comme mentionné précédemment, on retrouve également un élément terminateur T0 et sa protéine associée chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il est très intéressant de noter que, d'après une expérience de retardement sur gel, la protéine Reb1p démontre une affinité pour ce site de liaison cinq fois supérieure à celle observée pour le même site présent au niveau de l'amplificateur (Kulkens et al., 1989; Morrow et al., 1989). Cet élément terminateur T0 est situé environ entre 227 et 197 nucléotides en amont (-227 et -197) du TSS et est également connu pour avoir un effet positif sur le niveau de transcription de classe I (Vogelauer et al.,

1998). Ceci est fort peu surprenant d'autant plus que, contrairement à ce qu'on observe dans le modèle murin, il n'y a pas de promoteur intergénique justifiant la présence d'un élément terminateur supplémentaire pour protéger un éventuel complexe de préinitiation. Sa présence suggère donc un rôle similaire à celui observé chez la souris. Est-ce vraiment le cas ?

Malheureusement, notre connaissance du positionnement des nucléosomes au niveau du promoteur de classe I est très réduite chez la levure. Même problème lorsqu'il est question des modifications post-traductionnelles des histones au locus ribosomique. En effet, même si une abondante littérature traite de ce sujet, on y aborde presque toujours le lien avec la transcription de classe II au lieu de la transcription de classe I qui nous intéresse.

Le seul groupe à s'être intéressé à ce problème, tout en conservant la perspective qui nous concerne, est celui de Jeffrey Smith à l'Université de Virginie. Dans deux excellents articles publiés en 2002, les membres de ce laboratoire se sont entre autres intéressés aux modifications post-traductionnelles des histones au locus ribosomique. D'après ces travaux, tant dans la séquence du gène ribosomique que dans l'espace intergénique, on n'observe aucune différence dans le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 selon l'état de croissance (Sandmeier et al., 2002). Pour ce qui est du positionnement des nucléosomes selon l'état de croissance, aucun article ne traitant de ce sujet chez la levure n'est paru à ce jour.

Toutefois, comme évoqué dans un autre article du même groupe (Buck et al., 2002), l'existence de telles modifications de la chromatine associées avec un état transcriptionnel ou un autre au locus ribosomique de la levure ne fait pas de doute. Par contre, ces modifications ne sont peut être pas utilisées de la même façon que chez la souris. Prenons par exemple le cas de la protéine Sir2p. Cette histone désacétylase se trouve distribuée au locus ribosomique par son appartenance au complexe RENT. L'affinité de ce complexe pour l'ARN polymérase I lui permet d'affecter la chromatine transcrite par cette dernière de manière à empêcher l'ARN polymérase II de venir y œuvrer. Il semble donc qu'au locus ribosomique, le défi soit

d'établir une chromatine compatible avec la transcription, mais que celle-ci soit en plus spécifique à l'ARN polymérase I.

La lente progression des travaux en ce domaine chez *Saccharomyces cerevisiae* est certainement due à la difficulté technique de faire la distinction entre la chromatine transcriptionnellement active et inactive. Une nouvelle méthode est nécessaire si on veut espérer un rattrapage.

1.2.3.4 LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE

Malgré les importants changements dans la séquence de tous les éléments régulant la transcription du gène ribosomique, la machinerie transcriptionnelle demeure étonnement semblable d'un modèle à l'autre. Certains éléments divergents méritent toutefois d'être mis en lumière puisqu'ils sont abordés dans ce projet de recherche.

Telle que résumée dans les tableaux 1 et 2, la machinerie impliquée directement dans la transcription du gène ribosomique repose essentiellement sur les mêmes bases, peu importe le modèle utilisé. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la formation du complexe de préinitiation débute par la liaison d'un complexe à la partie distale du promoteur du gène ribosomique (Aprikian et al., 2001). Bien que la majorité des sous-unités de ce complexe puissent être supprimées sans empêcher la survie de la cellule (voir tableau 2), ce complexe, connu comme Upstream Activating Factor (UAF), a un effet majeur sur le niveau de transcription du gène ribosomique (Keys et al., 1996). Précisons, puisque cela n'est pas sans importance, que ce complexe contient des histones H3 et H4 qui participent à sa liaison à l'ADN. Le complexe UAF affecte le niveau de transcription en facilitant la liaison du complexe principal au niveau du promoteur proximal (Reeder, 1999). Ce complexe principal, ou Core Factor (CF) (Keys et al., 1994), permet ensuite à une forme phosphorylée de l'ARN polymérase I (Fath et al., 2001) complexée à Rrn3p de venir se lier au niveau du site d'initiation de la transcription et de commencer son œuvre (Aprikian et al., 2001)(voir figure 5).

Tableau 1. Liste des sous-unités de l'ARN polymérase I chez *Saccharomyces cerevisiae* et les mammifères

Sous-unités de l'ARN pol I de levure	Gène chez la levure	Effet d'une délétion	Humain et souris
A190	<i>RPA190</i>	Fatal	RPA194
A135	<i>RPA135</i>	Fatal	RPA135
A49	<i>RPA49</i>	Conditionnel	PAF53/PAF51?
Non Identifié			PAF49/Ase-1/CAST
A43	<i>RPA43</i>	Fatal	RPA43 = TWISTNB
AC40	<i>RPC40</i>	Fatal	RPA40
A34,5	<i>RPA34</i>	Viable	Non Identifié
ABC27	<i>RPB5</i>	Fatal	RPB25
ABC23	<i>RPB6</i>	Fatal	RPB14,4/RPB6
AC19	<i>RPC19</i>	Fatal	RPA16
ABC14,5	<i>RPB8</i>	Fatal	RPB17
A14	<i>RPA14</i>	Viable	Non Identifié
A12,2	<i>RPA12</i>	Conditionnel	RPA12
ABC10 α	<i>RPC10</i>	Fatal	RPB10a
ABC10 β	<i>RPB10</i>	Fatal	RPB10b

Tableau adapté de Moss T 2007

Tableau 2. Liste de facteurs de transcription de l'ARN polymérase I chez *Saccharomyces cerevisiae* et les mammifères

Saccharomyces cerevisiae	Délétion chez levure	Humain	Souris
Core Factor (CF)		SL1	SL1
Rrn6p	Fatal	TAFI 110	TAFI 95
Rrn7p	Fatal	TAFI 63	TAFI 68
Rrn11p	Fatal	TAFI 48	TAFI 48
TBP	Fatal	TBP	TBP
Upstream Activating Factor (UAF)		?	?
Rrn5p	Viable		
Rrn9p	Viable		
Rrn10p	Viable		
UAF30	Viable		
H3	Fatal		
H4	Fatal		
Rrn3p	Fatal	TIF-1A	TIF-1A
Hmo1p ?	Viable	hUBF	mUBF

Tableau adapté de Moss T 2007 et Reeder R 1999

Chez les mammifères la situation est légèrement différente (Moss et Stefanovsky, 2002). Au lieu d'avoir un complexe qui lie la partie distale du promoteur pour faciliter la transcription, une protéine à boîte HMG entre en jeu. La protéine UBF, qui contient 5 boîtes HMG de classe B (Stefanovsky et al., 1996), se lie de façon indiscriminée et sous forme de dimères à l'ensemble du locus ribosomique (O'Sullivan et al., 2002). Malgré tout, sa liaison se fait de façon très précise au niveau du promoteur distal et du promoteur proximal du gène ribosomique (Stefanovsky et al., 2001). La liaison de cette protéine, sans aucune homologie

avec le complexe UAF, facilite ensuite la liaison du complexe SL1 pour former le complexe de préinitiation de la transcription. Le complexe SL1 se lie au promoteur tant sur l'élément distal que proximal. Une fois le complexe SL1 en place, l'ARN polymérase I complexée à Rrn3p sous une forme activée (phosphorylée) vient se lier pour amorcer la transcription (voir figure 5) (Moss et al., 2007).

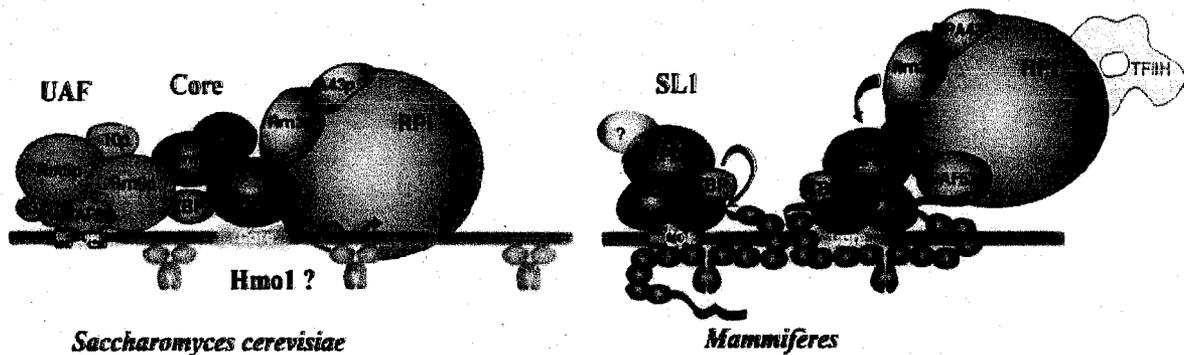


Figure 5. Machinerie transcriptionnelle selon le modèle (Adapté de Moss T 2007). La machinerie transcriptionnelle de classe I repose essentiellement sur les mêmes bases de la levure aux vertébrés. Le lien fonctionnel entre la machinerie transcriptionnelle de classe I et la protéine Hmo1p, combinée à l'importante homologie de cette dernière avec UBF soulève néanmoins des doutes sur l'étendue de notre compréhension du mécanisme chez la levure.

Là où le mécanisme devient véritablement intéressant chez les mammifères, c'est dans la façon par laquelle la protéine UBF stimule la transcription du gène ribosomique. La protéine UBF, comme toutes les protéines à boîtes HMG de classe B, aura pour effet de se lier à l'ADN et d'y induire une torsion. On croit que l'accumulation de cette torsion de l'ADN, causée par le positionnement précis de protéines UBF au promoteur du gène ribosomique, amène l'ADN à y former une structure pseudo-nucléosomale. On nomme cette structure *enhancesome* (Stefanovsky et al., 2001). L'*enhancesome* consiste tout simplement en une boucle exécutée par l'ADN sur environ 140 pb. La grande différence de cette structure face à un nucléosome est qu'elle est induite par UBF et qu'elle n'implique pas d'histones. Le positionnement de deux *enhancesomes* côte à côte au niveau du promoteur permettrait de rapprocher l'élément distal de l'élément proximal du promoteur (Bazett-Jones et al., 1994).

Ces deux éléments ainsi positionnés peuvent donc être liés de paire par le complexe SL1. Ne manque plus que l'ARN polymérase I et le tour est joué !

On voit généralement le complexe UAF chez la levure comme étant l'équivalent fonctionnel de la protéine UBF des vertébrés. En effet, tous deux ont pour effet de stimuler de façon importante le niveau de transcription du gène ribosomique par l'ARN polymérase I, tout en ne demeurant pas essentiels à la transcription en contexte *in vitro* (Keener et al., 1998; Smith et al., 1993). Par contre, comme on peut le voir au tableau 2, alors que chez les vertébrés UBF y est essentiel, le complexe UAF de la levure semble accessoire à la survie de la cellule. De plus, comme mentionné précédemment, aucune des sous-unités formant le complexe UAF ne possède d'homologie avec UBF. Ces observations nous amènent à faire deux constats. D'une part, la protéine UBF semble jouer un rôle allant au-delà du simple facteur de transcription en se liant sur l'ensemble du locus ribosomique, alors que le complexe UAF n'est connu que pour son rôle de facteur de transcription. Serait-il possible qu'une autre protéine vienne compléter ce rôle chez la levure ? D'autre part, bien que la suppression du complexe UAF chez la levure n'entraîne pas la mort de la cellule, le phénotype qui en est issu va bien au-delà du simple retard de croissance et mérite une attention particulière.

1.2.3.4.1 LA PROTÉINE Hmo1p

Bien que, chez *Saccharomyces cerevisiae*, on considère le complexe UAF comme étant l'équivalent fonctionnel de la protéine UBF, on continue à se questionner quant à l'existence d'un équivalent structurel de cette dernière chez la levure. En effet, on sait qu'il n'existe aucun orthologue d'UBF chez la levure. Toutefois, UBF semble jouer, en plus de son rôle de facteur de transcription, un rôle de facteur général de chromatine. Ceci suggère qu'une autre protéine puisse venir compléter le rôle du complexe UAF chez la levure.

Un des premiers candidats sérieux pour remplir ce rôle chez la levure est la protéine Hmo1p. Cette abondante protéine de 35 KDa, qui n'existe que chez *Saccharomyces cerevisiae* et de

proches parents comme *Saccharomyces kluyveri* (Neueglise et al., 2000), a été découverte en 1996 (Lu et al., 1996). Il s'agit, tout comme UBF, d'une protéine à boîte HMG de classe B. Contrairement à UBF, qui possède cinq de ces boîtes, Hmo1p n'en possède qu'une ou deux selon l'interprétation des auteurs (Gadal et al., 2002; Lu et al., 1996). Les premiers travaux indiquent que la boîte A lui confère sa préférence pour certains types de structure secondaires, alors que la boîte B lui confère sa capacité d'association à l'ADN avec une faible spécificité de séquence (Kamau et al., 2004).

On a découvert la protéine Hmo1p par accident en cherchant de nouvelles hélicases chez la levure. En la caractérisant, les auteurs ont réalisé que son activité hélicase était artéfactuelle, mais ont néanmoins réalisé l'intérêt de cette nouvelle protéine. Sa caractérisation fait notamment remarquer qu'il s'agit d'une protéine à boîte HMG de classe B assez typique, qu'elle possède essentiellement une localisation nucléaire et surtout que sa délétion entraîne un sérieux retard de croissance (Lu et al., 1996). Il faut attendre encore trois ans avant la parution d'un autre article traitant de cette protéine. Cet article du groupe de Joseph Heitman signale l'interaction physique et génétique de Hmo1 avec FKBP12 (Dolinski et Heitman, 1999). FKBP12 est un récepteur intracellulaire qui interagit entre autre avec la rapamycine dans le contrôle de la voie TOR. Cette découverte ouvrait à l'époque la porte sur l'idée que la protéine Hmo1p soit impliquée dans la régulation la transcription en lien avec la disponibilité des nutriments. Il faudra attendre quelques années encore avant de réaliser l'importance de cette découverte.

En 2002, une publication du groupe de Pierre Thuriaux signale une interaction génétique entre *HMO1* et plusieurs gènes codant pour des protéines de l'ARN polymérase I. Plus étonnant encore, on signale que la transcription du gène d'ARNr 35S, sous le contrôle d'un promoteur d'ARN polymérase II, permet de réchapper le phénotype *rpa49-Δ hmo1-Δ*, normalement fatal (voir tableau 1). Cet article publie donc les premiers indices établissant un lien fonctionnel, mais pas nécessairement physique, entre la protéine Hmo1p et la transcription ribosomique par l'ARN polymérase I.

2006 et 2007 ont vu la publication de quelques articles majeurs sur Hmo1p. Un premier par le groupe de Kevin Struhl et un autre par celui d'Olivier Gadal. Ces deux articles ont tous deux démontré que la protéine Hmo1p possède une distribution fort intéressante. Bien qu'*in vitro* cette dernière démontre une faible spécificité de séquence (Kamau et al., 2004), sa distribution dans le génome est tout le contraire. En effet, on note que Hmo1p est distribuée sur l'ensemble de la séquence codante du gène d'ARNr 35S en plus d'être présente au promoteur d'un fort pourcentage des gènes de protéine ribosomique (Berger et al., 2007; Hall et al., 2006). Un autre article du groupe de Tetsuro Kokubo précise que la présence de Hmo1p, au niveau du locus ribosomique, dépend de la présence de l'ARN polymérase I (Kasahara et al., 2007). La présence de Hmo1p au locus ribosomique semble donc être impliquée dans la transcription du gène d'ARNr 35S, mais au niveau de l'élongation plutôt que de son initiation. Ces premiers indices renforcent clairement l'idée d'un rôle complémentaire de Hmo1p à celui du complexe UAF.

Au-delà de sa simple présence au locus ribosomique, sa localisation au niveau du promoteur de nombreux gènes « RP » est également très intéressante. Les résultats du groupe de Struhl suggèrent que la liaison de Hmo1p aux promoteurs de gènes « RP » nécessite la présence de la protéine Rap1. Cette liaison est à son tour nécessaire à la liaison des protéines Fhl1p et Ifh1p à ces mêmes promoteurs. La présence des protéines Fhl1p et Ifh1p permet ensuite une activation maximale de l'expression des gènes « RP ». L'absence de Hmo1p n'empêchant pas l'expression des gènes « RP », les travaux du groupe d'Olivier Gadal ont cherché à préciser la fonction de cette protéine et à approfondir son lien avec la voie TOR évoquée précédemment (Dolinski et Heitman, 1999). Ces travaux établissent un lien génétique très net entre plusieurs membres de la voie TOR et *HMO1*. Les auteurs découvrent surtout que sans Hmo1p, la cellule ne parvient pas à moduler aussi efficacement le niveau d'expression des gènes « RP » en réponse à un stress nutritionnel induit à la rapamycine. Il semble donc que la protéine Hmo1p joue essentiellement un rôle de coordination entre la disponibilité des ressources, la transcription des gènes « RP » et peut être même l'élongation du transcrit du gène d'ARNr 35S (Berger et al., 2007).

1.2.3.4.2 LE PHÉNOTYPE « POLYMÉRASE SWITCH »

Contrairement à ce que l'on pourrait être porté à croire, la délétion de protéines formant le complexe UAF chez *Saccharomyces cerevisiae* n'entraîne pas la mort de la cellule. Le phénotype qui est issu de telles mutations nous en apprend tant sur la transcription au locus ribosomique qu'il mérite que nous nous y attardions un brin. La compréhension de ce phénotype particulier sera également nécessaire pour bien comprendre le pourquoi de certaines expériences de ce projet. Avant toute chose, faisons la distinction entre 2 types de mise en sourdine de la transcription souvent mélangés dans la littérature. D'une part, il y a la mise en sourdine de la transcription par l'ARN polymérase I, qui est due à une chromatine plus dense ne permettant pas à la machinerie transcriptionnelle d'œuvrer. D'autre part, il y a la mise en sourdine de la transcription par l'ARN polymérase II, que l'on va observer au locus HM, aux télomères et dans une certaine mesure au locus ribosomique.

En avril 1999, le groupe de Masayasu Nomura publie le premier de deux articles dans lequel on aborde un excitant nouveau concept : le changement de polymérase (Polymerase Switch) (Oakes et al., 1999; Vu et al., 1999). Les auteurs de ces articles ont réalisé que la délétion de protéines du complexe UAF n'entraîne pas la mort de la cellule. Au lieu de cela, les auteurs obtiennent une lignée avec une vitesse de croissance très réduite. Après un certain temps et quelques passages, on réussit toutefois à rétablir la vitesse de croissance typique de la lignée originale.

Une caractérisation de cette nouvelle lignée permet un étonnant constat. Les cellules transcrivent maintenant le gène d'ARNr 35S en utilisant l'ARN polymérase II. Bien que l'ARN polymérase II n'utilise pas le même site de départ pour la transcription du gène ribosomique, le transcrit permet la formation de ribosomes fonctionnels (Oakes et al., 1999). Plus étonnant encore, on réalise que l'absence du complexe UAF n'implique pas automatiquement ce phénotype de changement de polymérase ou PSW. L'état PSW n'est pas un phénotype automatiquement acquis par la disparition du complexe UAF, il s'agit plutôt

d'un état que la cellule peut ensuite acquérir suite à une période d'adaptation (Vu et al., 1999).

On sait que si aucune modification génétique n'est effectuée, il est à peu près impossible d'exprimer un gène de classe II intégré au niveau du locus ribosomique (Cioci et al., 2003), alors que l'ARN polymérase I n'a aucune difficulté à exprimer le gène ribosomique. Néanmoins, on note que sous ces mêmes conditions, il y a un certain niveau d'expression du gène ribosomique par l'ARN polymérase II. Ce niveau d'expression peut être significativement augmenté par certaines mutations de protéines du complexe UAF, notamment de la protéine UAF30p (Siddiqi et al., 2001). Notons que ce faible niveau de transcription par l'ARN polymérase II permet à la cellule de survivre à l'absence du complexe UAF avant son adaptation vers un phénotype PSW.

Cette période d'adaptation de la cellule nécessite plus que la simple disparition du complexe UAF. En effet, cette adaptation implique une augmentation très importante du nombre de copies du gène ribosomique (Oakes et al., 1999). Cette augmentation, qui permet à la cellule d'élever sa production de ribosome et ainsi de retrouver un temps de division normal, implique deux protéines importantes qui méritent d'être évoquées. La première de ces protéines, Fob1p, s'associe avec la séquence RFB (voir figure 2) et entraîne à ce niveau l'arrêt de la fourche de réplication. Cet arrêt de la fourche de réplication augmente d'un à deux ordres de magnitude les chances d'expansion du locus ribosomique par recombinaison homologue (Benguria et al., 2003; Oakes et al., 1999). Cet effet de l'arrêt de la fourche de réplication est encore augmenté en l'absence de Sir2p, le second facteur qui nous intéresse.

Ce second facteur, Sir2p, est une histone désacétylase NAD dépendante. Cette protéine est impliquée dans la mise en sourdine de l'expression de certains gènes et dans la stabilisation de séquences répétées à plusieurs endroits dans le génome (Moazed, 2001). Les cibles principales de son activité enzymatique sont les lysines 9 et 14 de l'histone H3, ainsi que la lysine 16 de l'histone H4. Bien qu'on la retrouve sous forme monomérique, on sait que Sir2p

a tendance à former des homotrimères. Cette tendance lui permet de former deux complexes qui ont des rôles et des distributions différentes (voir figure 6).

Le complexe Sir, formé de Sir2p, Sir3p et Sir4p, repose sur la forme monomérique de Sir2p et est distribué au niveau des télomères ainsi qu'aux loci HML et HMR. En association avec Rap1p, ce complexe participe à la mise en sourdine de la chromatine ainsi qu'à sa propagation. Pour ce faire, Rap1p déjà présente au locus permet le recrutement de Sir2p/Sir4p. La présence de ce complexe au locus entraîne la désacétylation des queues d'histones H3 et H4. Cette désacétylation entraîne ensuite le recrutement de Sir3p. Le recrutement de Sir3p aura pour conséquence de permettre ensuite l'arrivée d'un nouveau complexe Sir2p/Sir4p à proximité. Ce mécanisme répété en boucle entraîne donc la propagation de la mise en sourdine de la transcription (Hecht et al., 1995; Hecht et al., 1996).

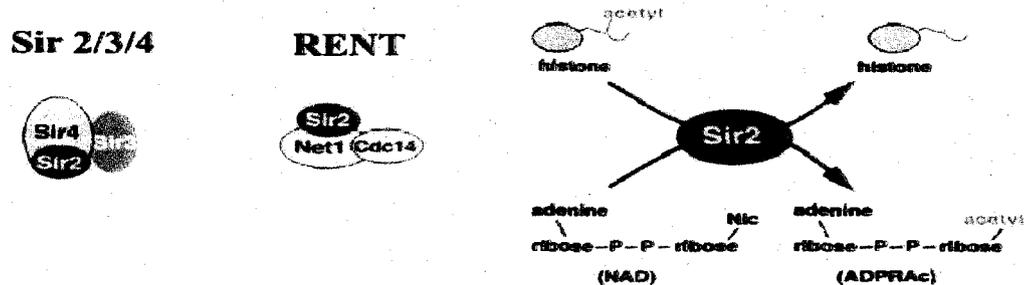


Figure 6. Complexes et mécanisme de Sir2p (Tiré de Moazed D 2001). Sir2p est une histone désacétylase NAD dépendante. Elle fait partie des complexes RENT et Sir 2/3/4, deux complexes importants dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes.

Pour sa part, le complexe RENT, comme brièvement évoqué à la section 1.2.3.3.2, est distribué au locus ribosomique (Huang et al., 2006) et dépend de la forme homotrimérique de Sir2p (Cubizolles et al., 2006). Net1p, la protéine centrale du complexe RENT, possède une forte affinité pour l'ARN polymérase I. Plusieurs suggèrent que l'ARN polymérase I, par son affinité pour Net1p, soit responsable de la distribution ribosomique du complexe RENT (Huang et al., 2006).

Dans ce contexte, l'intérêt de Sir2p est que cette protéine exerce un effet inverse à celui de Fob1p sur la propension des cellules à établir le phénotype PSW. Puisque la distribution du complexe RENT au locus ribosomique, tout comme sa contribution à la formation d'une chromatine ribosomique répressive, dépendent en partie de son interaction avec l'ARN polymérase I, la disparition de cette dernière facilite l'établissement du phénotype PSW (Oakes et al., 1999).

La présence du complexe RENT, donc de Sir2p, au niveau du promoteur et de la séquence codante du gène d'ARNr 35S a fait couler beaucoup d'encre. En effet, tel que mentionné précédemment, l'expression de tout gène de classe II intégré au locus ribosomique est mise en sourdine. Toutefois, alors que l'ARN polymérase II ne parvient que très faiblement à œuvrer au niveau du locus ribosomique, l'ARN polymérase I transcrit à ce même locus à un niveau très élevé. On s'est beaucoup questionné sur la cause de cette différence entre les deux ARN polymérases. Un article de Masayasu Nomura est toutefois venu apporter réponse à cette question (Cioci et al., 2003). La mise en sourdine d'un gène rapporteur de classe II au locus ribosomique est essentiellement due à l'incapacité de l'ARN polymérase II à accéder à l'ADN. Il semble que la présence de l'ARN polymérase I soit le principal facteur causant cet encombrement. L'effet de mise en sourdine du complexe UAF serait donc essentiellement causé par la grande stimulation qu'il exerce sur la transcription par l'ARN polymérase I. Évidemment, la présence du complexe RENT et la désacétylation des queues d'histones (Buck et al., 2002) qu'il entraîne complique encore davantage les choses pour l'ARN polymérase II.

Par opposition, la protéine Rpd3p, une autre histone désacétylase qui vise d'autres cibles que Sir2p (les lysines 5 et 12 de l'histone H4), a un effet complètement différent au locus ribosomique. Comme nous l'avons vu à la section 1.2.2, Rpd3p joue un rôle important sur le taux de copies du gène ribosomique accessible à l'ARN polymérase I. Au-delà de cet effet, un article récent de Masayasu Nomura signale qu'en contexte *rpd3Δ* il est pratiquement impossible à l'ARN polymérase II d'œuvrer au locus ribosomique et ainsi d'établir l'état

PSW (Oakes et al., 2006b). Tous ces exemples contribuent à mettre en lumière la grande importance des modifications post-traductionnelles des queues d'histones et de la structure de la chromatine en général sur la régulation de la transcription de classe I et II.

1.3 LES VARIANTS D'HISTONE DANS LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Il existe trois façons principales de réguler la transcription au niveau de la chromatine. Nous avons déjà abordé les deux premières, à savoir le remodelage de la chromatine et les modifications post-traductionnelles de l'ADN et des protéines associées. La dernière méthode connue pour réguler la structure de la chromatine consiste à incorporer dans les nucléosomes des variants, ou mutants non alléliques, des protéines impliquées dans la formation des histones majeures (Perche et al., 2003).

Les histones comptent parmi les protéines qui évoluent le moins rapidement que l'on connaît. Malgré cela, on connaît de nombreux variants de toutes les histones retrouvées dans la chromatine à l'exception de l'histone H4. Bien qu'ils ne s'agissent que de subtiles déclinaisons, les variants possèdent une fonction et une distribution souvent très différentes de leur paradigme, si bien que la majorité d'entre eux sont conservés d'une espèce à l'autre (Pusarla et Bhargava, 2005). Comment cela est-il possible ?

Les histones sont composées de trois hélices α reliées entre elles par de courtes boucles L1 et L2. Ensemble, ces hélices et boucles forment une structure connue comme l'«histone fold». Cette structure rigoureusement conservée est impliquée la dimérisation des histones. En plus de l'«histone fold», chaque histone possède également une queue à chaque extrémité (Luger et al., 1997). Contrairement à l'«histone fold» qui varie très peu même chez les variants, ces queues contiennent l'essentiel des variations observées tant entre les différentes histones que chez leurs variants (Clarkson et al., 1999). Ils revêtent donc une importance particulière dans l'étude des histones (Kamakaka et Biggins, 2005).

La variation que l'on observe dans les queues N- et C-ter des variants par rapport aux histones majeures est essentiellement responsable des différences fonctionnelles. Par exemple chez l'histone canonique H2A, qui nous intéresse particulièrement dans ce projet, la partie située en C-ter de la protéine semble servir de domaine de liaison pour les interactions avec d'autres nucléosomes. La partie N-ter interagit pour sa part avec l'ADN à proximité. On comprend donc aisément que des modifications post-traductionnelles de résidus interagissant avec l'ADN viennent affecter la liaison d'un nucléosome à l'ADN. Toutefois, des variations dans ces domaines de la protéine peuvent affecter la structure du nucléosome de bien d'autres façons. On note en effet des variants d'histones démontrant des changements dans les résidus de surface, de même que des nucléosomes avec une stabilité différente. Tous ces changements ont pour conséquences de créer des variations sur un même thème. Les particularités de toutes ces versions modifiées sont utilisées par la cellule pour réguler des fonctions très diverses (Pusarla et Bhargava, 2005).

1.3.1 LE VARIANT D'HISTONE H2A.Z

Parmi toutes les histones existantes, H2A.Z est l'histone qui nous intéresse le plus dans ce projet. Comme son nom l'indique, cette protéine est un variant de l'histone H2A qui représente cinq à dix pourcent du bassin d'histones H2A de la cellule (Leach et al., 2000). Contrairement à d'autres variants, H2A.Z est très conservée dans l'évolution (Jackson et al., 1996). La suppression de cette protéine est même létale chez les mammifères (Faast et al., 2001). Ceci est fort aisé à comprendre étant donné son implication dans la régulation de nombreux mécanismes. En effet, l'histone H2A.Z est connue pour être impliquée dans le contrôle de l'étalement de l'hétérochromatine (Meneghini et al., 2003; Raisner et al., 2005), la régulation de la transcription ainsi que dans la progression du cycle cellulaire. Les deux premiers de ces éléments étant particulièrement intéressants dans le contexte de ce projet, nous les aborderons ici en se concentrant toutefois sur le modèle *Saccharomyces cerevisiae*.

La formation de nucléosomes contenant un variant d'histone au lieu d'une histone régulière exige une machinerie particulière. Bien qu'on ne connaisse pas tout sur le mécanisme de déposition du variant H2A.Z, les groupes de Hiten Madhani, Jack Greenblatt et Carl Wu ont co-découvert en 2004 un complexe connu comme Swr1.com (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). Ce complexe est capable d'incorporer à la chromatine des dimères H2A.Z/H2B chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il est intéressant de noter que la sous-unité principale de ce complexe, Swr1p, est une ATPase ADN dépendante de la famille Swi/Snf. On note également qu'en plus du lien génétique les reliant, Swr1.com et le complexe NuA4 partagent plusieurs sous-unités. On fait également la même observation chez la mouche à fruits (Domino/p400 et Tip60)(Kusch et al., 2004) ainsi que chez l'être humain (SRCAP et Tip60) (Jin et al., 2005). Ceci suggère une possible implication de modifications post-traductionnelles comme l'acétylation des queues d'histones dans la déposition de H2A.Z. On ne connaît toutefois pas avec certitude par quel mécanisme la déposition de H2A.Z sera ciblée à tel ou tel autre endroit du génome. On suggère que le complexe Swr1.com puisse se lier à différents facteurs de transcription comme Reb1p (Raisner et al., 2005) ou encore que la sous-unité Bdf1p du complexe puisse reconnaître et lier certaines marques épigénétiques (Matangkasombut et Buratowski, 2003). Bien des points restent à éclaircir dans ce domaine.

En 2001 et 2003, les travaux du groupe de Luc Gaudreau ont révélé que le variant d'histone H2A.Z joue un rôle important dans la régulation de la transcription de certains gènes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Adam et al., 2001; Larochelle et Gaudreau, 2003). Des travaux subséquents du groupe de Hiten Madhani ont déterminé que, chez la levure, la transcription de plus de 300 gènes est affectée par le variant d'histone H2A.Z (Meneghini et al., 2003). De ce nombre, 214 le sont de façon positive et 107 de façon négative. Alors que les gènes réprimés par la présence de H2A.Z sont distribués de façon aléatoire, environ la moitié des gènes régulés positivement par le variant sont regroupés en 18 domaines nommés «HZAD». Presque tous ces domaines (83%) sont situés à proximité des télomères. Dans cet article, on signale également une nouvelle fonction du variant H2A.Z. Il semble qu'à proximité des

télomères ou d'une séquence d'ADN mise en sourdine, les nucléosomes contenant le variant H2A.Z empêchent l'étalement de l'hétérochromatine par un mécanisme de mise en sourdine Sir2/3/4 typique aux télomères (Moazed, 2001). Chez les HZAD situés à proximité de télomères, l'effet positif du variant H2A.Z sur le niveau de transcription des gènes est au moins en partie dû à cet effet.

Alors qu'on savait déjà que le variant d'histone H2A.Z possède une distribution étendue avec une forte présence aux télomères (Meneghini et al., 2003), on ignorait toutefois sa distribution plus précise dans le génome. En 2005 un autre article du groupe de Luc Gaudreau vint nous fournir réponse à cette question, du moins chez *Saccharomyces cerevisiae* (Guillemette et al., 2005). Selon cet article, on retrouve des nucléosomes contenant ce variant d'histone non pas sur quelques vastes domaines, mais plutôt à 4862 loci de petite taille dans le génome. Là où ces résultats deviennent carrément excitants, c'est que 74% de ces loci correspondent à des promoteurs et seulement 2% à des séquences codantes. Globalement, on retrouve donc des nucléosomes contenant le variant H2A.Z à 63% des promoteurs du génome, avec une préférence marquée pour les promoteurs inactifs (voir figure 7). En jetant un coup d'œil plus sérieux au niveau de ces promoteurs, on réalise que cet enrichissement en nucléosomes contenant le variant H2A.Z se fait sur une courte séquence correspondant à 1 ou deux nucléosomes. Selon l'article du groupe Gaudreau (Guillemette et al., 2005), cet enrichissement aurait plutôt tendance à être en aval de la séquence sans nucléosome (NFR). Par contre, d'autres auteurs (Yuan et al., 2005) préconisent plutôt un positionnement de nucléosomes de part et d'autre du NFR (voir fig 7).

Il devient très clair que le variant H2A.Z a un rôle dans la régulation de la transcription de nombreux gènes. Quel est donc son rôle à tous ces promoteurs? Une partie de la réponse à cette question réside dans l'organisation de la chromatine au niveau du promoteur. En effet, au gène *GALI* non encore transcrit, la présence du variant H2A.Z entraîne le déplacement sur une vingtaine de nucléotides d'un nucléosome près du TSS (Guillemette et al., 2005). Elle entraîne également une organisation plus régulière de la chromatine autour du promoteur

(voir figure 7). Il semble que ce léger déplacement d'un nucléosome ait un impact majeur sur la transcription du gène *GALI*. Intuitivement, on est porté à croire que cette architecture précise de la chromatine du promoteur inactif facilite le recrutement des différents facteurs de transcription nécessaires à l'activation. Toutefois, comme on sait que les nucléosomes contenant H2A.Z sont éjectés du promoteur à l'activation de la transcription du gène *GALI* (Adam et al., 2001), il n'est pas non plus exclu que ce nucléosome soit simplement plus facile à enlever qu'un nucléosome standard.

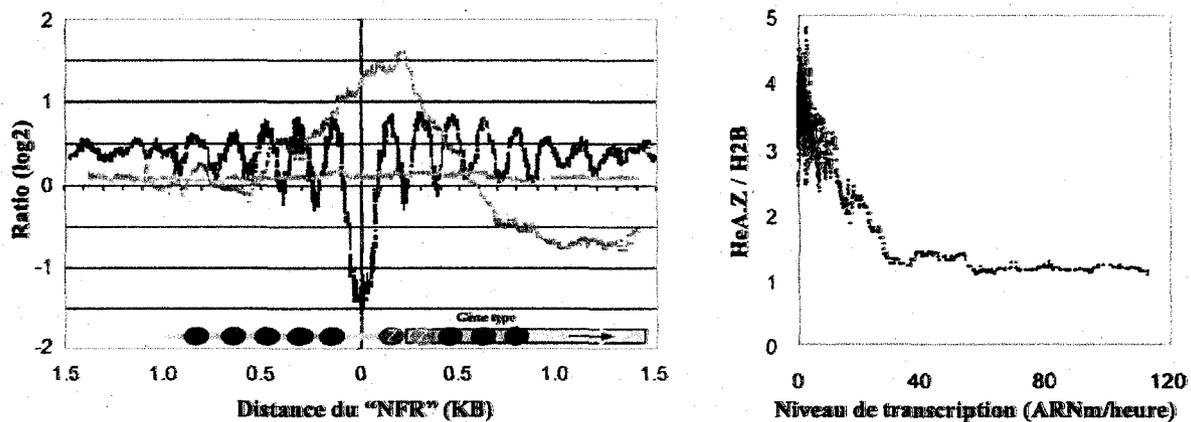


Figure 7. Distribution de H2A.Z aux promoteurs (Tiré de Guillemette B 2005). Malgré une distribution étendue, la variant H2A.Z (représenté par la ligne verte dans le panneau de gauche) se retrouve essentiellement distribué aux promoteurs, légèrement en aval du site NFR. On note également un enrichissement du variant H2A.Z au promoteur des gènes fortement exprimé (tel que représenté dans le panneau droite).

L'impact de H2A.Z sur la régulation de la transcription ne saurait être réduit à sa simple déposition au niveau du promoteur. Certains auteurs évoquent notamment l'acétylation de certains résidus du variant H2A.Z comme élément majeur dans la régulation de la fonction de ce dernier. On rapporte que l'acétylation de certains résidus du variant H2A.Z corrèle avec sa présence au promoteur de gènes transcriptionnellement actifs (Millar et al., 2006). Le pourquoi d'une telle corrélation demeure spéculatif à ce jour et reste à déterminer avec précision.

1.4 RÉGULATION COORDONNÉE DE LA BIOGÉNÈSE RIBOSOMIQUE

Comme on l'a vu à la section 1.1, la biosynthèse des ribosomes est un processus très coûteux en énergie pour la cellule. Qui plus est, cette voie de synthèse est très complexe puisqu'elle implique des centaines de gènes transcrits par les trois ARN polymérases. Au surplus, l'expression de tous ces gènes doit être finement régulée et synchronisée, car une mauvaise gestion aura des conséquences importantes sur l'efficacité reproductive de l'organisme. La cellule doit donc trouver une façon de réguler tous ces gènes simultanément tout en tenant compte des ressources disponibles. Nous allons donc rapidement voir de quelle façon procède la cellule pour accomplir cet exploit.

Au cours des vingt dernières années, les travaux de Jonathan Warner et Steven Zheng ont mis en lumière différents aspects de la régulation de la biosynthèse des ribosomes. On sait aujourd'hui que cette transcription est contrôlée par trois voies distinctes. En premier lieu, comme toute croissance soutenue nécessite une source de carbone, la disponibilité de celle-ci est établie et signalée au noyau via une voie Ras/cAMP/PKA (Neuman-Silberberg et al., 1995). En second lieu, la voie de sécrétion des protéines étant également nécessaire à la croissance, cette dernière aura également son mot à dire. Elle s'exprimera par la voie de la protéine kinase C (PKC) (Kamada et al., 1995; Nierras et Warner, 1999). Finalement, une troisième et dernière voie régule la biosynthèse des ribosomes en fonction de la disponibilité d'une source d'azote, il s'agit de la voie TOR (Powers et Walter, 1999). Dans le présent chapitre, nous nous limiterons toutefois à aborder uniquement cette dernière voie puisque ce mécanisme est le seul à être bien connu.

1.4.1 LA VOIE TOR

La rapamycine est une molécule immunosuppressive naturelle produite par *Streptomyces hygroscopicus*, une bactérie découverte sur l'île de Pâques. Cette molécule tient d'ailleurs son nom du nom local de l'île, Rapa Nui. La recherche faite sur cette molécule a entraîné la

découverte d'une nouvelle voie de signalisation, la voie TOR (pour Target Of Rapamycin). Comme mentionné ci-haut, cette voie est impliquée dans la régulation de la croissance en fonction de la disponibilité de ressources azotées (voir figure 8).

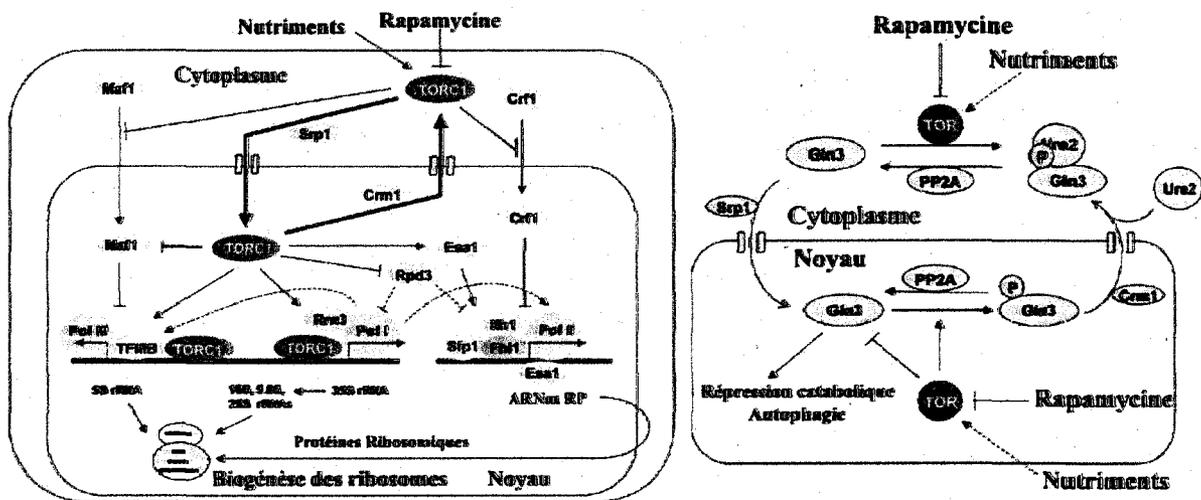


Figure 8. Voie TOR dans la régulation de la biogénèse des ribosomes (Tiré de Tsang CK 2007). Schéma représentant l'implication de la voie TOR dans la transcription chez la levure (panneau de gauche). Illustration du modèle de l'action et de la régulation de TOR dans le noyau et dans le cytoplasme (panneau de droite).

Comme nous l'avons vu à la section 1.2.3.4, afin de pouvoir se lier au niveau du promoteur, l'ARN polymérase doit être liée avec la protéine Rrn3p. Chez la levure, cette interaction dépend du niveau de phosphorylation de l'ARN polymérase I. On sait que la phosphorylation permettant l'interaction entre TIF-1A et l'ARN pol I est exécutée par mTor chez la souris (Tsang et Zheng, 2007). Bien que cela soit à démontrer chez la levure, il est probable que Tor1p soit également responsable de la phosphorylation de l'ARN pol I. Pour que cela soit possible, le complexe Tor1c (formé de Tor1p, Kog1p, Lst8p, Tco89p) doit être importé au niveau du noyau. Afin que la distribution du complexe Tor1c soit un mécanisme dynamique non aléatoire, Tor1p possède deux courts domaines qui gèrent sa localisation. Un premier domaine connu comme NLS (⁵⁹⁴PRVVRK) interagit avec la protéine Srp1p et permet l'importation nucléaire, alors que le domaine NES (¹⁰³¹LVPLTLTLFL) permet d'exporter la protéine vers le cytoplasme via Crm1p (Li et al., 2006a).

Lorsque la rapamycine est liée au récepteur FKBP12, le complexe ainsi formé se lie au domaine de liaison FR de la protéine Tor1p (Chen et al., 1995). Ceci a pour effet d'entraîner la sortie de Tor1c du noyau. Lorsque Tor1c est confiné au cytoplasme, la régulation de la transcription des gènes « RP » et du gène ribosomique est affectée, autre confirmation de l'importance de cette voie de signalisation dans la régulation de la biosynthèse des protéines (Li et al., 2006a).

Selon les travaux du groupe de Steven Zheng, non seulement la voie TOR est impliquée dans la régulation de la transcription au locus ribosomique, mais le complexe Tor1c s'associe directement au promoteur des gènes d'ARNr 5 et 35S via le domaine HTH de Tor1p (Li et al., 2006a; Tsang et al., 2003). Une fois au promoteur, Tor1p permet l'association Rrn3p/ARN pol I en phosphorylant la polymérase. Lors d'un traitement à la rapamycine ou d'un manque de nutriments, Tor1c est chassé du locus ribosomique vers le cytoplasme. Le complexe Rpd3p/Sin3p peut ensuite venir s'installer au locus ribosomique et réprimer la transcription en désacétylant les lysines 5 et 12 de l'histone H4 (Tsang et al., 2003). Bien que ce recrutement de Rpd3p/Sin3p au locus ribosomique soit également confirmé par les travaux du groupe Schreiber (Humphrey et al., 2004), le groupe de Masayasu Nomura a récemment publié un article pour contredire ce point précis (Oakes et al., 2006b). Même si la majorité des auteurs semblent croire Steven Zheng, le doute demeure toujours à ce sujet.

De nombreux articles démontrent à l'unisson depuis plus d'une quinzaine d'années l'implication de la voie TOR dans la régulation et la coordination de l'expression des gènes « RP » (Powers et Walter, 1999). Le mécanisme est toutefois resté un mystère jusqu'à tout récemment. La structure générale du promoteur est très conservée d'un gène « RP » à l'autre. Cette structure a d'ailleurs compliqué passablement la compréhension de ce mécanisme. En effet, la très grande majorité de ces promoteurs possèdent deux sites de liaison à Rap1p en tandem de 250 à 400 nucléotides en amont du TSS, 5'-ACACCCAYACAYYY-3' (Idrissi et Pina, 1999). En plus de ces deux sites, on retrouve également une séquence riche en thymine environ 180 nucléotides en amont du TSS.

On a rapidement découvert que ces séquences étaient nécessaires à l'activation ainsi qu'à la répression de l'expression des gènes « RP ». Cela semblait peu étonnant puisqu'on connaissait déjà Rap1p pour son implication dans l'activation et dans la répression de l'expression de plusieurs gènes. Le nom de la protéine est d'ailleurs tiré de l'anglais « Repressor Activator Protein » (Morse, 2000). Pour expliquer cet étrange mécanisme, on suggère que le rôle de Rap1p au promoteur soit d'ouvrir la chromatine pour faciliter la liaison d'autres facteurs régulant la transcription positivement ou négativement (Morse, 2000). Le mécanisme demeure toutefois incompris jusqu'à la publication de deux articles par le groupe de Richard Warner en 2005 et 2006. Dans ces articles (Rudra et al., 2005; Zhao et al., 2006), on rapporte que la présence de Rap1p au promoteur ne varie pas selon l'état transcriptionnel des gènes, mais qu'elle permet plutôt le recrutement de Fhl1p et Ifh1p quelques nucléotides en aval des sites Rap1. Ces protéines impliquées dans l'activation de la transcription des gènes « RP » ne sont toutefois pas les seules recrutées au promoteur par Rap1p. En effet, Rap1p permet également la présence du complexe NuA4 et de sa sous-unité Esa1p au promoteur (Reid et al., 2000). Le complexe NuA4 et l'acétylation des lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 qu'il entraîne sont également nécessaires à l'activation de la transcription. Une stimulation à la rapamycine entraîne une désacétylation des histones à ce niveau qui semble médiée ici aussi par le complexe Rpd3p/Sin3p (Rohde et Cardenas, 2003). On découvrira plus tard, l'importance de la protéine Hmo1p (Berger et al., 2007; Hall et al., 2006) dans cette régulation comme on peut le voir à la section 1.2.3.4.1.

Malgré toutes ces découvertes importantes, il demeurerait difficile de se faire une vue d'ensemble de la régulation de la biosynthèse des ribosomes jusqu'à la publication d'un article exceptionnel du groupe de Christophe Carles et Michel Riva (Chedin et al., 2007; Laferte et al., 2006). On savait alors que la répression de la transcription des gènes « RP » était rapide suite à une répression à la rapamycine, mais on ignorait complètement l'ordre précis des événements (Miyoshi et al., 2001). Au cours de ces travaux, les membres de l'équipe de « Mécanistique et régulation des ARN polymérases » ont généré une souche de levure nommée CARA. Dans cette souche l'ARN polymérase I est constitutivement associée

à Rrn3p et n'est plus affectée par un traitement à la rapamycine ou un manque de nutriments. La comparaison des niveaux d'ARN messagers entre une souche sauvage et une souche CARA suite à un traitement à la rapamycine a permis d'établir que la régulation de la transcription des gènes « RP » se fait en aval de la transcription de classe I. Ceci est très intéressant car la transcription de classe I se retrouve ainsi au centre de la régulation de la biosynthèse des ribosomes, suggérant peut être un rôle de direction et de coordination sur l'ensemble du processus. La transcription de classe III semble toutefois moins directement contrôlée par ce mécanisme. Ces nouveaux éléments sont très excitants puisqu'ils augmentent encore l'intérêt de l'étude de la régulation de la transcription de classe I, objectif du présent projet.

1.5 LES TRAVAUX

Au début de mes travaux, on ne connaissait pratiquement rien sur la protéine Hmo1p, si ce n'est qu'elle possède une intéressante homologie avec la protéine UBF et que sa délétion entraîne un fort ralentissement de croissance. Mes travaux ont donc initialement été orientés vers l'étude de ce facteur prometteur. Nous nous sommes en premier lieu intéressés à sa distribution au locus ribosomique ainsi qu'à son interaction avec le promoteur du gène ribosomique. Les résultats obtenus ainsi que des avancées majeures réalisées par Olivier Gadal et Kevin Struhl nous ont amenés à travailler sur un aspect jusque là non abordé de l'étude de la transcription ribosomique.

Connaissant depuis peu l'existence du variant d'histone H2A.Z au locus ribosomique, nous nous y sommes intéressés. En premier lieu, nous avons étudié son « comportement » au promoteur du gène ribosomique, ainsi que son effet sur la régulation de la transcription de classe I. Nous avons également étudié son comportement au promoteur d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse de ribosomes.

Les résultats obtenus évoquent une implication du variant d'histone H2A.Z dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes et appuient l'idée de l'existence d'une chromatine particulière au locus ribosomique.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CELLULES

Tous les travaux ont été effectués dans des levures *Saccharomyces cerevisiae*. Les souches utilisées sont décrites au tableau 3.

Tableau 3. Liste des souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées

Nom de la souche	Souche de base	Type sexuel	Génotype
PSW	W303	a	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 his3-11 can1-100 rrn9::HIS3</i>
PSWZ	W303	a	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 his3-11 can1-100 rrn9::HIS3 htz1-(MYC)9</i>
W303	W303	alpha	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1</i>
MAY 424	W303	alpha	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 htz1Δ::KanMX</i>
W303 Hmo1 3Myc	W303	alpha	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 hmo1-(MYC)3</i>
W303	W303	a	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1</i>
W303 H2A.Z Myc	W303	a	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 htz1-(MYC)3</i>
W303 H2A.Z Myc H2B HA	W303	a	<i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 htz1-(MYC)3 htb1-(HA)3</i>
BY4742	BY4742	alpha	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
BY4742ΔSir2	BY4742	alpha	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sir2Δ::KanMX</i>
BY4742ΔHtz1	BY4742	alpha	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 htz1Δ::KanMX</i>
BY4742ΔRpd3	BY4742	alpha	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rpd3Δ::KanMX</i>
BY4742ΔRpd3 H2A.Z MYC	BY4742	alpha	<i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 htz1Δ::KanMX htz1-(MYC)9</i>

2.1.1 MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

Toutes les cultures de levures ne nécessitant pas de sélection ont été réalisées dans un milieu YPD. Ce milieu a été préparé en ajoutant 10 g de «bacto yeast extract» (BioShop; #YEX401.500) et 20 g de bacto peptone (Sigma; #P0556-1KG) par 1000 mL d'eau distillée. La version solide de ce milieu a été préparée en rajoutant 15 g d'agar par litre de milieu. Après stérilisation, 20 g de dextrose (BioShop; #GLU501.1) ont été ajoutés par litre de milieu. Le dextrose a été solubilisé dans l'eau distillée et filtré avec un filtre 0.45µm (Corning; #431220) avant d'être ajouté au milieu encore chaud pour éviter la caramélisation des sucres.

Toutes les cultures de levures nécessitant une sélection particulière ont été réalisées soit dans un milieu CSM-URA ou CSM-TRP. Ce milieu a été préparé en ajoutant 6.7 g de nitrogen base W/O amino acids (Sigma; #Y0626-250G) et 0.74 g de CSM-URA (Sigma; #Y-1501-20G) ou CSM-TRP (Sigma; #Y-1876-20G) par 1000 mL d'eau distillée. La version solide de ce milieu a été préparée en rajoutant 15 g d'agar par litre de milieu. Après stérilisation, 20 g de dextrose ont été ajoutés par litre de milieu. Le dextrose a été solubilisé dans l'eau distillée et filtré avec un filtre 0.45µm avant d'être ajouté au milieu encore chaud pour éviter la caramélisation des sucres.

2.1.2 PRÉCULTURES ET CULTURES

Toute souche utilisée pour une expérience a été préalablement cultivée une nuit entière dans le milieu approprié selon le besoin ou non de sélection. Toutes les précultures ont été inoculées à partir d'une colonie unique d'environ 2 mm de diamètre dans 30 mL de milieu approprié. Toutes les précultures ont été incubées 8 à 12 heures à 30°C sous agitation (200 RPM). L'incubation a été réalisée dans un incubateur (New Brunswick Scientific; #59721-1). Les cellules ont été incubées jusqu'à l'obtention d'une culture possédant une DO_{600nm} de 1.0 à 1.5 sur un spectrophotomètre Ultropec 2100 pro (Amersham; #80-2112-21).

Ces cultures ont ensuite été diluées à DO_{600nm} 0.1 dans un volume approprié aux besoins de l'expérience à réaliser. Elles ont été remises en culture à 30°C sous agitation (200 RPM).

2.1.3 TRAITEMENT À LA RAPAMYCINE

Les cellules ont été stimulées à la rapamycine (A.G. Scientific; #AY-22989) de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0.45. C'est alors qu'elles ont été soumises à la stimulation à la rapamycine. La rapamycine a été utilisée à une concentration finale de 0.1µg/mL de culture. La période de stimulation typique utilisée a été de 60% du temps de division de la souche utilisée. La rapamycine étant soluble dans le DMSO (Sigma; #D4540-500mL), les stimulations ont été réalisées à partir d'un stock à 5µg/mL afin de réduire le volume de DMSO dans les cultures.

2.1.4 CONDITIONS PLATEAU

Les cellules en conditions plateau ont été préparées de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules sont mises en culture jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 1.0. Elles ont ensuite été laissées en culture pour une période de 12 à 24 heures selon la souche. On a ensuite vérifié la DO_{600nm} de la culture aux trois heures pour s'assurer de la stagnation de la DO_{600nm} .

2.1.5 PRÉPARATION DE LEVURES COMPÉTENTES

Les cellules utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine ont été préparées de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules ont été mises en culture dans 50 mL jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0.4 à 0.6. Elles ont été récoltées par centrifugation à 1000 x g pour 5 minutes à 4°C et lavées à deux reprises dans l'eau stérile. Elles ont été

resuspendues dans 500 μ L d'eau stérile et transférées dans un microtube stérile puis centrifugées à 15000 x g pour 1 minute à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans 500 μ L de tampon A (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1M LiOAc (Sigma; #4158-100G)) et incubées 1 heure à 30°C avec agitation. Les cellules ont été utilisées immédiatement pour la transformation.

2.1.6 TRANSFORMATION DE LEVURES COMPÉTENTES

Pour effectuer la transformation de levures, 100 μ L de cellules compétentes fraîchement préparées ont été mélangées à 15 μ L du produit de recombinaison (au moins 1 μ g), 5 μ L d'ADNsss (10 μ g/ μ L) (Promega; #D181B) et 700 μ L du tampon B (PEG40% (Sigma; #P4338-500G), 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1M LiOAc). Le mélange a été brièvement vortexé et incubé 3 heures à 30°C. Le mélange a été transféré à 42°C pendant 10 minutes. Les cellules ont été centrifugées à 8000 x g pour 15 sec et resuspendues dans 200 μ L d'eau stérile. Elles ont été étalées sur un pétri avec sélection appropriée, puis incubées de 48 à 72 heures à 30°C.

2.2 ANALYSE D'EXPRESSION

2.2.1 RÉCOLTE DES ARN

Les cellules utilisées pour la récolte de l'ARN total ont été préparées de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules ont été mises en culture dans 10 mL jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0.8. Elles ont été récoltées par centrifugation à 1000 x g pour 5 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 2 mL de milieu Y1 (SC typique ajusté à pH 7.4, 1M Sorbitol (Fisher; #S459-500), 0.1M EDTA et 0.1% 2-mercaptoethanol (Sigma; #M3148-25ML)) contenant 100 unités de lyticase/zymolase (Sigma; #L5263-25KU) par mL. Les cellules ont été incubées 40 minutes à 30°C sous agitation ou jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 5 à 10% de la valeur initiale. Les sphéroplastes ont été récoltés par une

centrifugation à 300 x g pendant 5 minutes. Le reste de la purification a été réalisé avec la trousse RNeasy mini kit (Qiagen; #74104) selon le protocole du manufacturier pour la levure. L'ARN a été stocké à -80°C.

2.2.2 VÉRIFICATION DES ARN

Le dixième de l'extraction d'ARN a été chargé sur un gel de 1% d'agarose dans le tampon SB (16.7 mM de H₃BO₃, 5 mM NaOH, pH 8.4). La migration a été réalisée à 235 V pendant 20 minutes.

2.2.3 TRANSCRIPTION INVERSE

Dans un tube PCR, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de random primers (100 µM), 2 µL d'ARN (1 µg/µL) et 9 µL d'eau DEPC ont été mélangés. L'échantillon a été chauffé à 65°C pendant 5 minutes et incubé sur glace pour 1 minute. Ont été ajoutés 4 µL du tampon First Strand Buffer 5X, 2 µL 0.1M DTT et 1 µL de RNaseOUT (Invitrogen; #10777-019). Le tube a été agité et incubé à 37°C pour 2 minutes. 1 µL (200 unités) de M-MLV RT (Invitrogen; #28025-013) a été ajouté et l'échantillon a été incubé pour 10 minutes à température ambiante. Le mélange a été incubé 50 minutes à 37°C puis inactivé à 70°C pendant 15 minutes. Les ADNc ont été conservés à -80°C.

2.3 ANALYSE D'ENRICHISSEMENT

2.3.1 IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE

Les cellules utilisées pour l'immunoprécipitation de la chromatine ont été préparées de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules ont été mises en culture dans 50 mL et cultivées selon les besoins de l'expérience (exponentielle, stimulation à la rapamycine ou plateau). Lorsque les conditions désirées ont été atteintes, 1400 µL de formaldéhyde 37%

ont été ajoutés à la culture et le mélange a été incubé pour 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont été transférées à 4°C et incubées 12 heures sous agitation constante. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 2000 x g pour 5 minutes à 4°C. Le culot a été lavé au TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), séché, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C. Une fois les cellules resuspendues dans 1000 µL de tampon de lyse (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 1mM PMSF, 1µg/mL Pepstatine et 1µg/mL Leupeptine), 500µL de billes de verres ont été ajoutées (Sigma; G8772-100G). Les cellules ont été vortexées 120 minutes à 4°C puis débarrassées des billes. Les cellules ont été sonifiées 4 x 20 secondes à 50% (Branson; #101-063-588) et centrifugées à 21000 x g et 4°C pendant 10 minutes. 5µL du surnageant ont conservés à -20°C comme contrôle. Le reste du surnageant a été incubé en présence de 50µL d'une solution de billes Protéine A-Agarose (Santa Cruz; #sc-2001) saturée d'anticorps (50 µL solution de billes 50%(v/v), PBS pH 7.4, BSA 5mg/ml, anticorps*). Le mélange a été incubé sous agitation constante à 4°C pour 12 heures. Après cette incubation, les billes ont été centrifugées à 21000 x g et 4°C pendant 10 minutes. Après avoir été débarrassées du surnageant, les billes ont été successivement lavées 2 fois dans le tampon de lyse (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate), 2 fois dans le tampon de lyse modifié (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate), 2 fois dans le tampon de lavage (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, 0,5% NP40, 0,5% Na-deoxycholate, 1mM EDTA), une fois dans le TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) puis finalement éluées dans 65µL du tampon d'éluion (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 1%SDS) pendant 20 minutes à 65°C. 50µL du surnageant ont été transférés dans un autre microtube avec 120 µL de TE/SDS (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1%SDS) pendant 12 heures à 65°C. Parallèlement, 95 µL de TE/SDS ont été ajoutés au contrôle sans IP, incubés également pendant 12 heures à 65°C. 150µL du mélange C (25 µg RNaseA, 30µg glycogène (USB; #16445-5GM), 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) ont été ajoutés à l'échantillon et au contrôle puis incubés 3 heures à 37°C. 15 µL de protéinase K 10µg/µL ont été ajoutés à chaque tube et les tubes ont été incubés 3 heures à 37°C. L'ADN a été purifié

par deux extractions phénol-chloroforme 1 :1 (BioShop; PHE512.100), resuspendu dans 100µL de TE et conservé à -20°C.

Anticorps utilisés :

(Boehringer; #1 583 816)	anti-HA 12 CA 5	3µL/échantillon
(Abcam; #ab32)	anti-Myc 9 E 10	5µL/échantillon
(Abcam; #ab1791)	anti-H3	5µL/échantillon

2.3.2 PCR EN TEMPS RÉEL

1 µL d'ADN a été mélangé avec 1 µL de Hotstart Taq (Taq thermosensible maison) diluée 10 fois, 7.3 µL d'eau distillée, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.1 µL de chaque amorce d'une paire à 100 µM et 10 µL de tampon qPCR 2X (12 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 150 mM trehalose, 0.2% (v/v) tween 20, 0.2 mg/mL de BSA et 0.139 X SYBR green (Invitrogen; #S7563)). Le tout a été mélangé dans les puits d'une plaque 96 puits (Ultident; #26190). Le tout a toujours été rigoureusement préparé sur glace. Une fois les bouchons installés, la plaque a été centrifugée pendant 2 minutes à 1500 x g et insérée dans la machine de PCR en temps réel (Stratagene; #MX3000). Le cycle PCR a été le suivant 30 sec à 95°C, 45 sec à 60°C et 60 sec à 72°C. Ce cycle a été répété 40 fois. Il fut précédé de 10 minutes à 95°C et suivi par 8 minutes à 72°C. La validité des résultats a été vérifiée par une analyse des courbes de dissociation des produits PCR.

2.4 ANALYSE DE Hmo1p

La souche de *E. coli* DH5α a été transformée avec le plasmide « pET30c #3 yHmo1 His tag » qui exprime la protéine Hmo1p avec une étiquette histidine. Les colonies ont été sélectionnées sur un pétri LB avec kanamycine (50µg/mL). Par la suite, 100 mL de culture ont été inoculés avec une colonie et amenés à une DO_{600nm} de 0.5. La culture a ensuite été induite avec 0.5 mM d'IPTG (Fisher; #BP1755-10) pendant 4 heures sous agitation constante

à 37°C. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 10000 x g, à 4°C. Le culot a été resuspendu dans le tampon de bris cellulaire (10% glycérol, 50mM acétate de potassium, 10mM MgCl₂, 0.5mM NaEDTA, 0.5mM NaEGTA, 0.15 M Tris-HCl pH 8.0, 1mM PMSF, 1µg/mL Pepstatine et 1µg/mL Leupeptine) puis sonifié (35 fois 1 seconde, à 70% d'amplitude) sur glace. L'échantillon a été centrifugé 20 minutes à 12 000 x g, à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 1000 µL de tampon de dénaturation (10% glycérol, 50mM acétate de potassium, 10mM MgCl₂, 0.5mM NaEDTA, 0.5mM NaEGTA, 0.15 M Tris-HCl pH 8.0, 8M urée) puis incubé pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation. L'échantillon a été sonifié sur glace (35 fois 1 seconde, à 70% d'amplitude) puis centrifugé 20 minutes à 12 000 x g, à 4°C. Le surnageant a été soumis à 8 rondes successives de dialyse d'une durée de 90 minutes chacune contre 200 mL de tampon de dialyse (10% glycérol, 50mM acétate de potassium, 10mM MgCl₂, 0.5mM NaEDTA, 0.5mM NaEGTA, 0.15 M Tris-HCl pH 8.0, 4M urée), en diminuant la concentration d'urée par un facteur de 2 à chaque dialyse, jusqu'à 0.125 M urée. Une dernière dialyse a été réalisée contre 200 mL de tampon de dialyse sans urée. L'échantillon dialysé a été centrifugé pendant 20 minutes à 12 000 x g, à 4°C. Le surnageant a été purifié sur colonne.

2.4.1 PURIFICATION DE Hmo1p

La protéine Hmo1p a été purifiée sur une colonne His-Trap HP (GE Bioscience; #17-5247-01) de 1 mL. La protéine a été chargée sur FPLC puis est éluée en fractions de 500 µL. Les éluions ont été réalisées par tranches de 10 mL dans le tampon d'éluion (100 mM acétate de potassium, 10 % glycérol, 20 mM tris-HCl pH 8,0) en augmentant successivement la concentration d'imidazole de 10, 25, 50, 100, 200 et 500 mM. Les fractions correspondant au sixième pic d'éluion (voir figure 9) ont été réunies en un même échantillon. Cet échantillon a été dialysé afin de retirer l'imidazole. La dialyse a été réalisée pendant 3 heures à 4°C contre 200 volumes de tampon de renaturation (20 mM Tris-acétate pH 8,0, 100 mM acétate de potassium, 20 % glycérol). L'échantillon dialysé a été centrifugé à 12 000 x g, pendant 20

minutes, à 4°C. Le surnageant a été récupéré, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

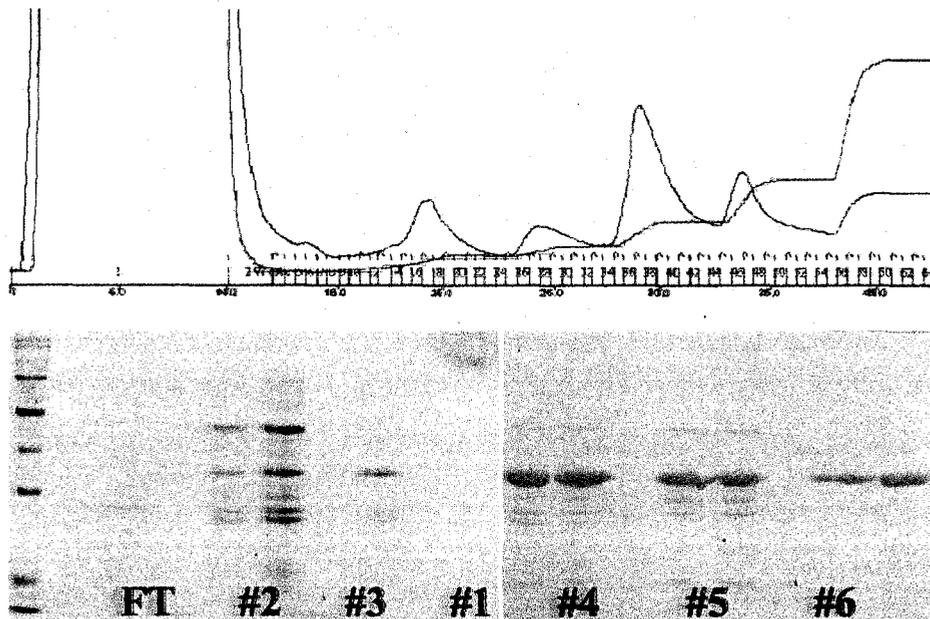


Figure 9. Suivi de purification de Hmo1p. Hmo1p a été purifiée sur une colonne His-Trap HP par élution avec un tampon contenant une concentration croissante d'imidazole (10, 25, 50, 100, 200 et 500 mM). Le contenu des puits est le suivant, FT : Filtrat, #1 : Éluat à 10 mM, #2 : Éluat à 25 mM, #3 : Éluat à 50 mM, #4 : Éluat à 100 mM, #5 : Éluat à 200 mM, #6 : Éluat à 500 mM.

2.4.2 RÉACTIONS DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE - PCR

Dans un tube, 1 μL de dNTPs 10 mM, 0.3 μL Taq polymérase (NEB; #MO267L), 1 μL d'ADN génomique 100 ng/ μL , 5 μL de tampon 10 X, 0.25 μL de chacune des amorces 100 μM et 42.2 μL d'eau stérile ont été mélangés. Le cycle PCR a été le suivant : 45 sec à 95°C, 60 sec à la température d'hybridation et 60 sec à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois et terminé par 8:00 à 72°C.

Les amorces utilisées, ainsi que les températures d'hybridation sont regroupées dans le tableau 4. Les températures d'hybridation ont été déterminées selon le logiciel en ligne du site de la compagnie IDT.

Tableau 4. Liste des amorces utilisées

Numéro	Position	Orientation	Séquence
152	rDNA -2147	Sens	GCACCATCAGAGCGGCAAA
129	rDNA -1868	Antisens	CTTTTCTTCTTCCCAGTAGCC
130	rDNA -1667	Sens	GAGGGTGTAGAAAAAGACGA
131	rDNA -1468	Antisens	TATCCAGCTGCACTCTTCTT
135	rDNA -155	Sens	AGCTTAAATTGAAGTTTTTC
136	rDNA 54	Antisens	ACTCGAATTCGTTTCCAAAC
139	rDNA 734	Sens	GTCTCAAAGATTAAGCCATG
154	rDNA 961	Antisens	AAAGTTATTATGAATCATCA
144	rDNA 6534	Sens	TGCGTGGGGATAAATCATT
145	rDNA 6760	Antisens	CCCGGATCATAGAATTCTTA
244	URA3 -450	Sens	AGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTC
246	URA3 -755	Antisens	CTGTAACGTTCACCTCTACCTTAGC
380	5S prom	Sens	ACTACAGTTGATCGGACG
381	5S prom	Antisens	AAAAATTGTCCTCCACCC
417	Rps18B prom	Sens	CAACATATCTGCACTGTACT
418	Rps18B prom	Antisens	TGACACCTTTGCTATCCTAA
419	Rps21 prom	Sens	AACAATTTTTCCAAATCGAC
420	Rps21 prom	Antisens	TTATGGTATGGTCTCTTCTT
421	Rps22B prom	Sens	TTAACCCACTATTTTTTTCA
422	Rps22B prom	Antisens	AACTTGATGATAACCTTGGA
434	Act1	Sens	GTTGCTGCTTTGGTTATTGA
435	Act1	Antisens	ATTGGGTAACGTAAGTCAA
137	434	Sens	GGGGTATCTGTTTGGTGAA
138	633	Antisens	CACCTATTCCTCTTGCTG

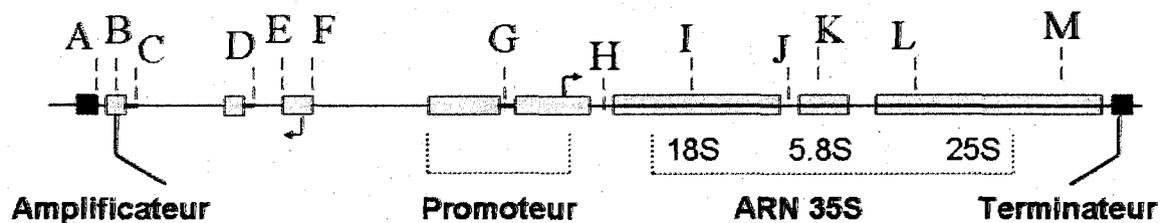


Figure 10. Distribution des groupes d'amorces utilisées sur le locus ribosomique.

2.4.3 MARQUAGE RADIOACTIF DE SONDAS ADN

La sonde utilisée pour l'empreinte à la DNase I a été préparée de la façon suivante : 5 μL de l'amorce #135 (100 μM) (voir tableau 4), 30 μCi $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) (Perkin Elmer; #BLU002A250UC), 2 μL de tampon T4 PNK 10X, 1 μL T4 PNK (NEB; #MO201S) ont été mélangés dans un volume complété à 20 μL dans l'eau et incubés 60 minutes à 37°C. La T4 PNK a été inactivée par une incubation de 10 minutes à 65°C. La sonde a été produite par un PCR régulier (voir section 2.4.2), à la différence que 5 μL de l'amorce #135 marquée ont été utilisés (au lieu de 1 μL #135 à froid) en combinaison avec 0.25 μL de l'amorce #136 (100 μM). Le produit PCR a été purifié sur une colonne sephadex G25 (GE; #28-9180-04) pendant 1 minute à 3500 x g.

Les sondes utilisées pour les gels de retardement ont été préparées de la façon suivante. Les sondes ont été préparées comme des produits PCR réguliers (voir section 2.4.2). Les produits PCR ont été purifiés en utilisant la trousse QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen (Qiagen; #28104). 30 fmol de sonde, 30 μCi $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), 2 μL de tampon T4 PNK 10X, 1 μL T4 PNK ont été mélangés dans un volume complété à 20 μL dans l'eau et incubés 60 minutes à 37°C. Les sondes ont été purifiées sur une colonne sephadex G25 pendant 1 minute à 3500 x g.

La sonde utilisée pour la réticulation au psoralen a été préparée de la façon suivante. La sonde a été préparée comme un produit PCR régulier (voir section 2.4.2) avec les amorces #137 et #154. Le produit PCR a été purifié en utilisant la trousse QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen (Qiagen; #28104). 10 μL (25 ng) de sonde et 1 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) d'hexanucléotide ont été mélangés dans un volume complété à 30 μL dans l'eau et incubés 2 minutes à 95°C. Le mélange a ensuite été incubé sur glace pendant 1 minute et fut centrifugé à 20 000 x g pour 15 secondes. 5 μL de Tampon NEB2 10X, 1 μL de Klenow, 5 μL dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ et 1 μL dNTPs 5mM (sans dCTP) furent ajoutés à l'échantillon puis ajusté à 50 μL avec de l'eau.

Le mélange fut incubé pendant 60 minutes à 37°C. La sonde a ensuite été purifiée sur une colonne sephadex G25 pendant 1 minute à 3500 x g.

2.4.4 EMPREINTE À LA DNASE 1

Un gel dénaturant de 40 mL de polyacrylamide 6% été coulé (6 % acrylamide:bis-acrylamide (29:1), 90mM borate de Tris, 2 mM EDTA, pH 8.3, 0.04% TEMED et 0.08% APS). Les échantillons ont été préparés tel qu'indiqué au tableau 5 et incubés 30 minutes à température ambiante. La DNase 1 a été ajoutée et incubée 2 minutes à température ambiante avant l'ajout de 60 µL du tampon d'arrêt (1% SDS, 600 mM NaCl, 20 mM EDTA, 40ng/nL ARNt). L'ADN digéré a été purifié par une extraction phénol-chloroforme 1 :1. L'ADN purifié a été resuspendu dans 5 µL de tampon de chargement (formamide 97.5%, xylène cyanole 0.3%, bleu de bromophénol 0.3%, EDTA 10 mM) et chargé sur le gel de polyacrylamide précouru pendant 45 minutes. Le séquence de la même sonde, réalisée en utilisant la trousse (USB; #70770KT) a été chargée en parallèle sur le même gel. La migration a été réalisée à 1500 V pendant 2 heures. Le gel a été démoulé et séché à 80°C pendant 45 minutes. Les gels ont été exposés pour une période de 24 à 36 heures.

2.4.5 RETARDEMENT SUR GEL

Un gel non dénaturant de 100 mL de polyacrylamide 4% a été coulé (4% acrylamide:bis-acrylamide (29:1), 90mM de borate de Tris, 2 mM d'EDTA, pH 8.3, 0.1% TEMED, 0.1% APS) et préchauffé pendant 60 minutes à 100 V dans un tampon TBE 0.5X. Les échantillons ont été préparés en mélangeant 1 µL de sonde marquée (33 fmol/µL) avec 4µL de glycérol 50%, 4µL de tampon de liaison 5X (0.5% Triton X-100, 50% glycérol, 50 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8.0 et 50 mM NaCl) et 1 µL d'une dilution de la protéine. Les échantillons ont été incubés 60 minutes à 4°C. 4 µL de glycérol 50% a été ajouté à chaque échantillon avant d'être chargé sur gel. La migration a été réalisée à 100 V pendant 3 heures

30 minutes. Le gel a été démoulé et séché à 80°C pendant 45 minutes. Les gels ont été exposés pour une période de 24 à 36 heures.

Tableau 5. Conditions utilisées pour l'expérience d'empreinte à la DNaseI

Puits	1	2	3	4	5	6
H2O	29µL	24µL	24µL	29µL	24µL	24µL
Sonde (250pmol/mL)	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL
Solution 50% glycérol	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL
Mélange de cofacteurs 20X	3µL	3µL	3µL	3µL	3µL	3µL
Tampon d'incubation 5X	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL
Hmo1 20X 100nM	0µL	0µL	0µL	3µL	3µL	3µL
Hmo1 20X 250nM	0µL	0µL	0µL	0µL	0µL	0µL
DNase I (différentes dilutions)	0µL	5µL	5µL	0µL	5µL	5µL
	0 u	0,0625 u	0,0125 u	0 u	0,0625 u	0,0125 u
Puits	7	8	9	10	11	12
H2O	29µL	24µL	24µL	29µL	24µL	24µL
Sonde (250pmol/mL)	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL	4µL
Solution 50% glycérol	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL
Mélange de cofacteurs 20X	3µL	3µL	3µL	3µL	3µL	3µL
Tampon d'incubation 5X	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL	12µL
Hmo1 20X 100nM	0µL	0µL	0µL	0µL	0µL	0µL
Hmo1 20X 250nM	3µL	3µL	3µL	12µL	12µL	12µL
DNase I (différentes dilutions)	0µL	5µL	5µL	0µL	5µL	5µL
	0 u	0,0625 u	0,0125 u	0 u	0,0625 u	0,0125 u

Tampon d'incubation 50% glycérol
5X :
0,5mM EDTA
2,5 mM DTT
50 mM Tris pH 8.0

Mélange cofacteurs 20X: 10 mM MgCl₂
5 mM CaCl₂

2.4.6 RÉTICULATION AU PSORALEN

2.4.6.1 RÉTICULATION

Les cellules utilisées pour la réticulation au psoralen ont été préparées de la façon suivante. Après une préculture typique, les cellules ont été mises en culture dans 150 mL et cultivées jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0.8. Les cellules ont été lavées à deux reprises dans 50 mL d'eau froide stérile et récoltées par centrifugation à 1000 x g pour 5 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 2 mL de milieu Y1 (SC typique ajusté à pH 7.4, 1M Sorbitol (Fisher; #S459-500), 0.1M EDTA et 0.1% 2-mercaptoethanol (Sigma; #M3148-25ML)) contenant 200 unités de lyticase/zymolase (Sigma; #L5263-25KU). Les cellules ont été incubées 60 minutes à 30°C sous agitation ou jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 5 à 10% de la valeur initiale. Les sphéroplastes ont été récoltés par une centrifugation à 300 x g pendant 5 minutes. Les sphéroplastes ont été lavés à deux reprises dans 5 mL de tampon de lavage (SC typique ajusté à pH 7.4, 1M Sorbitol (Fisher; #S459-500), 0.1M EDTA et 0.1% 2-mercaptoethanol). Après avoir été récoltés à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C, les sphéroplastes ont été resuspendus dans le TE 1X à une densité de $5 \times 10^8 \phi /mL$. La suspension de cellules a ensuite été distribuée à raison de 1440 μL par puits dans une plaque à 6 puits (Corning; #3516). Ont ensuite été ajoutés 70 μL d'une solution stock de Psoralen (200 $\mu g/mL$ de CH_3CH_2OH) dans chaque puit et irradié sur glace pendant 5 minutes à 6 cm de distance avec une lampe UV à haute intensité (Spectronics; #BLE100S). L'irradiation a été répétée à 7 reprises en ajoutant à chaque fois un nouvel aliquot de Psoralen (Alexis; #ALX-350-364-M025). Les sphéroplastes ont été réunis en un seul échantillon puis lavés à deux reprises dans 5 mL de tampon de lavage. Le culot a été resuspendu dans 3 mL du tampon de lyse (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate) avec 500 μL de billes de verres et vortexé (Sigma; #G8772-100G) 5 minutes à puissance maximale puis débarrassé des billes. Le surnageant a été centrifugé à 21000 x g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été ajusté à 167 μg RNaseA par mL et incubé 4 heures à 37°C sous agitation. Le surnageant a été ajusté à

1 mg/ml Protéinase K et incubé 4 heures à 37°C sous agitation. L'ADN a été purifié par deux extractions phénol-chloroforme 1 :1 (BioShop; #PHE512.100), resuspendu dans 100µL de TE et conservé à -20°C.

2.4.6.2 BUVARDAGE SOUTHERN

Dans 250µL, 30 µg d'ADN réticulé, 25 µL de tampon EcoRI 10X, 3 µL de EcoRI (NEB; #R0101M) ont été mélangés. L'échantillon a été incubé à 37°C pendant une douzaine d'heures, purifié par deux extractions phénol-chloroforme 1 :1 (BioShop; #PHE512.100) et resuspendu dans 50µL de TE. L'ADN digéré a été chargé sur un gel de 1% d'agarose dans le tampon SB (16.7 mM de H₃BO₃, 5 mM NaOH, pH 8.4). La migration a été réalisée à 2V/cm pendant 48 heures à l'abri de la lumière. Le gel a été irradié à 5 cm pendant 3 heures sous un rayonnement UV de 256 nm (Spectronics; #BLE256). Le gel a été immergé dans 200 mL de HCl 0.125 M pendant 10 minutes, sous agitation constante, puis rincé doucement à l'eau distillée. Le gel a été incubé 45 minutes dans 200 mL de tampon de dénaturation (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), puis lavé doucement à l'eau distillée. Le contenu du gel a été transféré sur une membrane de nylon Hybond N+ (GE Healthcare; #RPN2250B) pendant 48 heures, par capillarité dans le tampon SSC 6X (0.9 M NaCl, 0.09 M Trisodium citrate). La membrane a été cuite pendant 2 heures, à 80°C.

2.4.6.3 HYBRIDATION

La membrane a été réhydratée dans le tampon SSC 6X pendant 15 minutes. La membrane a été préhybridée dans le tampon de préhybridation (SSC 6X, Denharts 5X, 0.1 % SDS, 0.1 % pyrophosphate de sodium, 10 % dextran sulfate, 100 µg/ml ADN_{ss}) pendant 4 heures à 65°C, sous une faible agitation. La membrane a été transférée dans la solution d'hybridation à 65°C contenant la sonde radiomarquée. La sonde a été préparée tel qu'indiqué à la section 2.4.3, incubée à 95°C pendant 10 minutes et ajoutée 30 mL de solution d'hybridation (SSC 6X, Denharts 5X, 0.1 % SDS, 0.1 % pyrophosphate de sodium, 10 % dextran sulfate, 100

$\mu\text{g/ml}$ ADNsss, 10 mM EDTA). La membrane a été incubée pendant 24 heures, sous agitation constante. La membrane a été lavée 3 fois dans 100 mL de la solution de lavage LOW (SSC 3X, 0.1 % SDS, 0.1 % pyrophosphate de sodium) à 65°C, pendant 10 minutes. La membrane a été lavée 3 fois dans 100 mL de la solution de lavage MEDIUM (SSC 1X, 0.1 % SDS, 0.1 % pyrophosphate de sodium) à 65°C, pendant 10 minutes. La membrane a été lavée 3 fois dans 100 mL de la solution de lavage HIGH (SSC 0.1X, 0.1 % SDS, 0.1 % pyrophosphate de sodium) à 65°C, pendant 10 minutes. La membrane a été séchée à température ambiante et exposée sur phosphorimager pendant 24 heures, puis révélée.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Hmo1p

Tel que présenté à la section 1.2.3.4.1, plusieurs éléments suggèrent que la protéine Hmo1p puisse, à l'image de la protéine UBF chez les vertébrés, jouer un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes. Nous nous sommes donc initialement intéressés à certaines caractéristiques de la protéine Hmo1p chez *Saccharomyces cerevisiae* afin d'en faire la comparaison avec la protéine UBF.

3.1.1 DISTRIBUTION AU LOCUS RIBOSOMIQUE

Le groupe de Brian McStay ayant rapporté en 2002 que la protéine UBF est distribuée sur l'ensemble du locus ribosomique (O'Sullivan et al., 2002), nous nous sommes demandés si la protéine Hmo1p possédait une distribution similaire au locus ribosomique de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons construit une souche de levure dans laquelle la protéine Hmo1p possède une étiquette Myc en position C-ter. La position C-ter de l'étiquette fut préférée à tout autre position puisqu'il est connu qu'un bouleversement de cette partie de la protéine n'entraîne pas de retard sur la croissance (Lu et al., 1996). Nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour déterminer la distribution *in vivo* de la protéine Hmo1p dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Comme on peut le voir à la figure 11, nous observons un certain niveau d'enrichissement de la protéine Hmo1p aux promoteurs des gènes d'ARNr 5 et 35S et son absence au niveau de l'amplificateur.

Compte tenu que l'enrichissement est observé aux promoteurs, nous nous sommes demandés si l'on pouvait corréler cet enrichissement à un état transcriptionnel. Étant donné la difficulté technique de séparer les gènes transcriptionnellement actifs de ceux inactifs, nous avons

répété l'expérience suite une stimulation à la rapamycine. Nous n'observons pas de différence significative dans l'enrichissement de Hmo1p aux promoteurs selon les conditions de croissance.

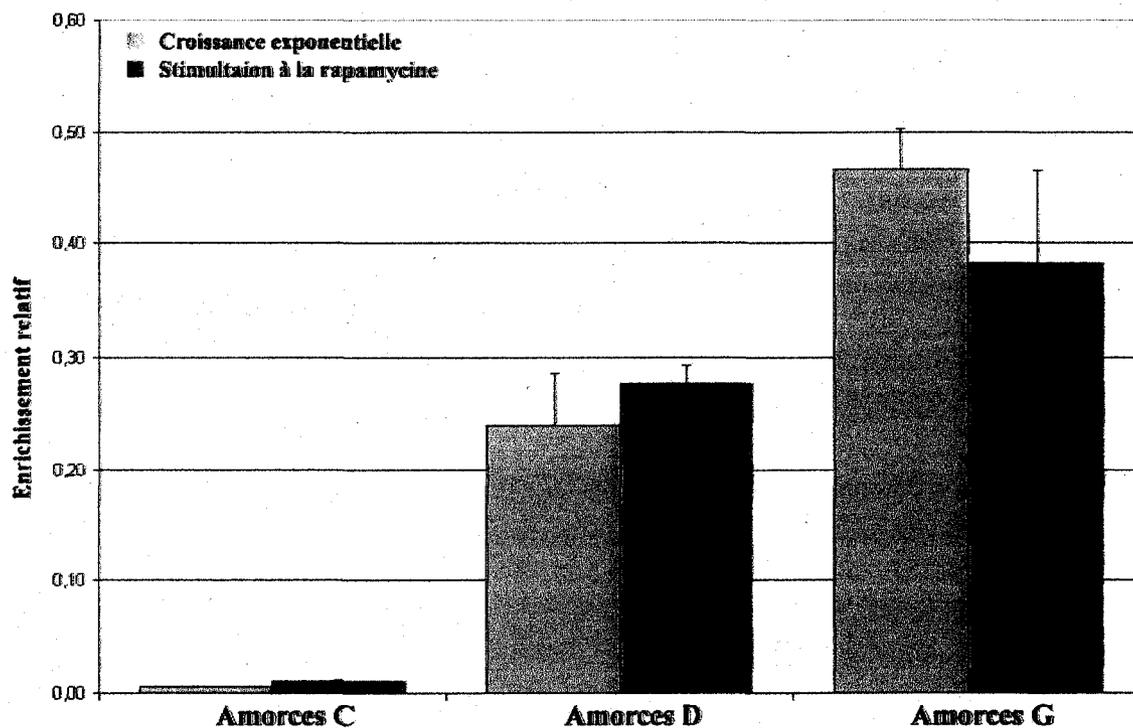


Figure 11. Enrichissement de Hmo1p au locus ribosomique de *Saccharomyces cerevisiae*. L'enrichissement de Hmo1p a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à Hmo1p. L'enrichissement a été déterminé aux promoteurs des gènes d'ARN 5S, 35S ainsi qu'au niveau de la séquence amplificatrice. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0) ou sur des cellules en arrêt de croissance (traitées pendant 60 minutes avec 0,1 µg/ml de rapamycine). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de Hmo1p. Tel que représenté à la figure 10, les amorces C servent à l'amplification du site «amplificateur», les amorces D au site «promoteur 5S» et les amorces G au site «promoteur 35S».

3.1.2 INTERACTION AVEC LE PROMOTEUR DU GÈNE D'ARNr 35S

On sait que la protéine UBF interagit de façon très précise avec le promoteur du gène ribosomique chez les vertébrés. Connaissant la façon dont UBF interagit avec le promoteur (Bazett-Jones et al., 1994), nous avons cherché à voir si l'on pouvait faire une corrélation

avec la façon dont Hmo1p se lie au promoteur du gène d'ARNr 35S chez la levure. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'empreinte à la DNaseI en contexte *in vitro*.

Nous avons premièrement cloné une protéine Hmo1p exprimant une étiquette histidine en C-ter dans un vecteur pET30 (Invitrogen; #69909). Nous avons ensuite exprimé cette protéine dans des cellules *E. coli* DH5 α . La protéine s'exprimant fortement sous forme de corps d'inclusion, nous avons renaturé ces derniers avant d'en purifier la protéine Hmo1p. La purification, réalisée sur colonne His-Trap HP, a permis d'obtenir une bonne quantité de la protéine d'intérêt très pure (voir élution #6 figure 9). Une fois débarrassée de l'imidazole par dialyse, la protéine a pu être utilisée pour l'expérience d'empreinte à la DNase I.

La sonde utilisée pour cette expérience correspond à la séquence promotrice du gène d'ARNr 35S. Elle s'étend de 155 nucléotides en amont, à 54 nucléotides en aval du TSS. Nous avons incubé 1×10^{-12} mol de la sonde en présence de quantités croissantes de la protéine Hmo1p. La comparaison entre la digestion de sonde non protégée ou incubée avec des quantités croissantes de la protéine purifiée (100 et 250 nM) ne met en lumière aucune différence significative (voir figure 12). Il ne semble pas y avoir de protection de zone particulière du promoteur par la protéine Hmo1p dans les conditions utilisées.

3.1.2 AFFINITÉ POUR LA SÉQUENCE PRIMAIRE DU LOCUS RIBOSOMIQUE

Connaissant la distribution au locus ribosomique de la protéine UBF chez les vertébrés, nous avons voulu vérifier si Hmo1p possède une affinité particulière pour la séquence primaire au niveau du locus ribosomique. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de retardement sur gel. Ayant déjà purifié une protéine Hmo1p recombinante pour l'expérience d'empreinte à la DNase I, nous l'avons également utilisée pour l'expérience de retardement sur gel. 33 fmol des sondes ont été incubés sous les mêmes conditions que celles utilisées pour l'expérience d'empreinte à la DNase I.

Les sondes, incubées en présence de quantités croissantes de la protéine (0, 25, 50, 100 et 250 nM) ne démontrent d'affinité particulière pour aucune des portions testées du locus ribosomique. La protéine démontre exactement la même affinité pour une séquence non ribosomique située dans la séquence codante du gène *URA3* (voir figure 13). En contexte *in vitro*, la protéine Hmo1p ne semble pas avoir d'affinité particulière pour la séquence primaire du locus ribosomique.

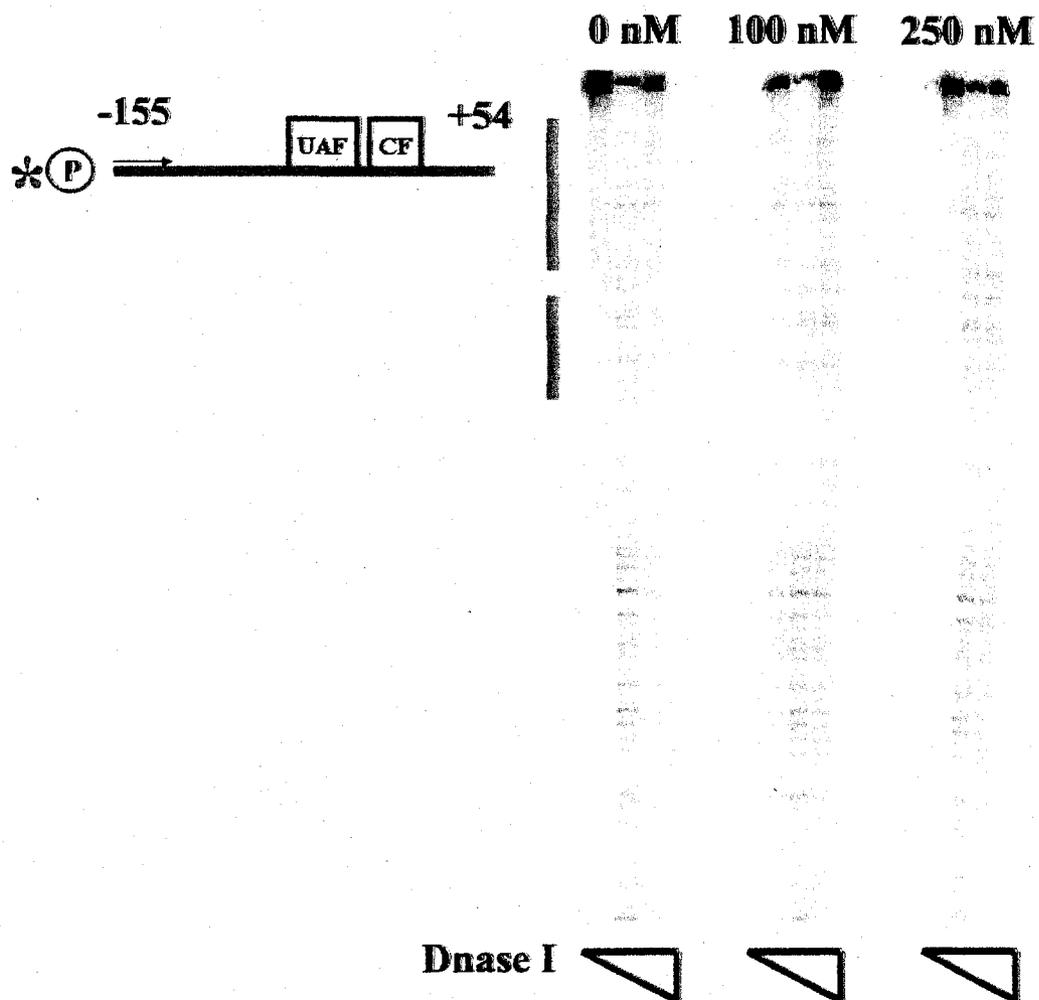


Figure 12. Empreinte à la DnaseI de Hmo1p sur le promoteur du gène d'ARNr 35S. L'interaction de Hmo1p avec la section -155 à +54 du promoteur du gène d'ARNr 35S de *Saccharomyces cerevisiae* a été déterminée par empreinte à la DNaseI. L'essai a été réalisé avec 1 pmol de sonde radiomarquée incubée avec des quantités croissantes de Hmo1p (0, 100 ou 250 nM). La digestion à la DNase a été réalisée avec des concentrations croissantes d'enzyme (0, 0.0625 et 0.125 unité).

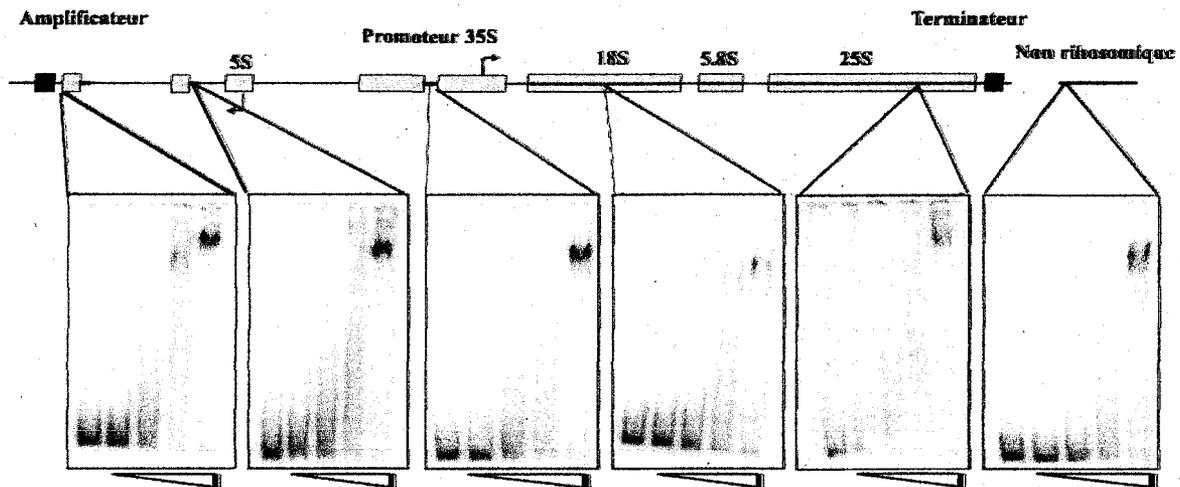


Figure 13. Affinité de la protéine Hmo1p selon le site au locus ribosomique chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'affinité de la protéine Hmo1p pour la séquence primaire du locus ribosomique a été déterminée par un essai de retardement de migration sur gel. L'essai a été réalisé sur 33 fmol de sonde radiomarquée incubée avec des quantités croissantes de Hmo1p (0, 25, 50, 100 et 250 nM). Les sondes utilisées ciblent les séquences suivantes : séquence amplificatrice de l'espace intergénique (premier panneau), promoteur du gène ARNr 5S (second panneau), promoteur du gène ARNr 35S (troisième panneau), séquence 18S du gène d'ARNr 35S (quatrième panneau), séquence 28S du gène d'ARNr 35S (cinquième panneau), ainsi qu'une séquence non ribosomique (dernier panneau).

3.2 VARIANT D'HISTONE H2A.Z

En 2005, un article rapporte la présence du variant d'histone H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique (Guillemette et al., 2005). Nous nous sommes donc demandés si la présence du variant H2A.Z à ces promoteurs jouait un rôle sur la régulation de la biosynthèse des ribosomes. Nous nous sommes aussi demandés si la présence de ce variant d'histone au locus ribosomique pouvait être impliquée dans l'établissement d'une chromatine particulière à ce locus.

3.2.1 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT AU LOCUS RIBOSOMIQUE

Nous avons utilisé une souche de levure développée par le groupe de Luc Gaudreau de l'Université de Sherbrooke. Cette souche est celle utilisée dans l'article faisant remarquer la présence du variant d'histone H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique

(Guillemette et al., 2005). Il s'agit d'une souche haploïde qui exprime le variant d'histone H2A.Z avec une étiquette MYC en C-ter. En plus de cette modification, cette souche exprime également une version de l'histone canonique H2B avec une étiquette hémagglutinine (HA) en C-ter.

Nous avons premièrement reconfirmé la présence du variant d'histone H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Tout comme dans l'article de (Guillemette et al., 2005), nous avons réalisé deux expériences d'immunoprécipitation de la chromatine en parallèle. D'une part, une première immunoprécipitation de la chromatine associée au variant d'histone H2A.Z permet de mesurer son enrichissement à un endroit précis du génome. Une seconde immunoprécipitation contre l'histone canonique H2B est réalisée pour mesurer l'enrichissement de cette histone canonique. Cette seconde mesure d'enrichissement est utilisée pour normaliser la valeur d'enrichissement en variant d'histone. Puisque ces deux histones sont présentes dans les nucléosomes contenant le variant H2A.Z, cette normalisation permet d'éliminer le biais induit par un enrichissement ou un appauvrissement local en nucléosomes.

Comme on peut le voir à la figure 14, nous avons également noté un enrichissement du variant d'histone H2A.Z aux promoteurs des gènes d'ARNr 5 et 35S. Afin de voir si nous pouvions corréler la présence du variant d'histone H2A.Z avec un état transcriptionnel, nous avons répété ces expériences sur des cellules traitées à la rapamycine, ainsi que chez des cellules en phase stationnaire. On remarque que l'enrichissement observé est plus important au niveau du promoteur de classe I. On remarque également que l'enrichissement observé en H2A.Z au niveau des deux promoteurs est réduit de 50% après un traitement à la rapamycine et d'environ 80% sur des cellules en phase stationnaire. La présence du variant d'histone H2A.Z aux promoteurs du locus ribosomique corréle donc avec l'activité transcriptionnelle.

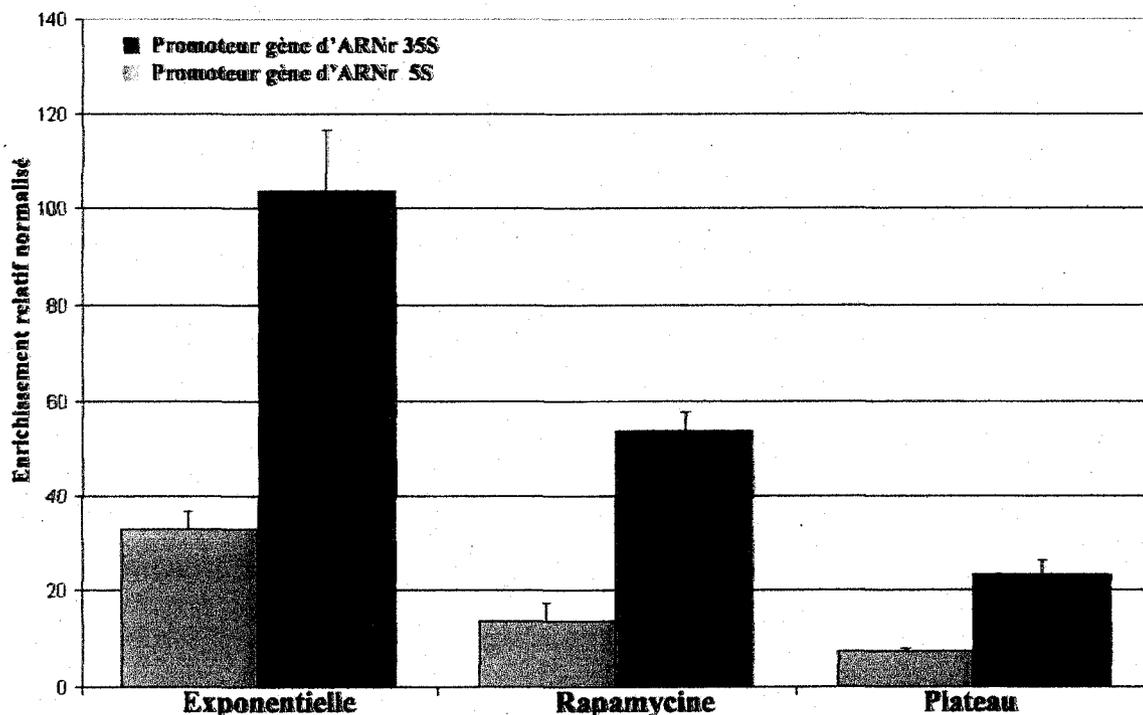


Figure 14. Enrichissement en H2A.Z au locus ribosomique selon l'état de croissance. L'enrichissement de H2A.Z a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à H2A.Z et normalisée sur l'enrichissement de H2B aux mêmes sites. L'enrichissement a été déterminé aux promoteurs des gènes d'ARN 5S et 35S. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0), sur des cellules en arrêt de croissance (60 minutes de traitement à la rapamycine à 0,1 µg/ml) ou en condition plateau (DO 600 nm +16 heures de croissances). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de H2A.Z et un anticorps dirigé contre l'étiquette HA de H2B.

3.2.2 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT À CERTAINS GÈNES « RP »

Puisque l'enrichissement du variant d'histone H2A.Z corrèle avec l'activité transcriptionnelle de classe I et III au locus ribosomique, nous nous sommes demandés ce qu'il en est chez des gènes de classe II impliqués dans la biosynthèse des ribosomes. Nous sommes donc allés voir au niveau du promoteur de quelques gènes de protéines ribosomiques.

Dès 138 gènes de classe II codant pour des protéines ribosomiques, (Guillemette et al., 2005) note la présence du variant d'histone H2A.Z à une très grande majorité des promoteurs. Nous en avons donc choisi trois au hasard chez lesquels nous avons étudié le comportement de

H2A.Z. Il s'agit des gènes *RPS18b*, *RPS21* et *RPS22b*. Tout comme pour les promoteurs des gènes d'ARNr 5 et 35S, nous avons procédé à l'immunoprécipitation de la chromatine associée au variant d'histone H2A.Z en parallèle à celle de l'histone canonique H2B aux promoteurs de ces trois gènes.

Comme on peut le voir aux figures 15,16 et 17, cette première expérience nous a permis de confirmer la présence du variant H2A.Z aux promoteurs de ces gènes. Nous avons ensuite répété ces expériences sur des cellules stimulées à la rapamycine, ainsi que chez des cellules en phase stationnaire. On remarque que contrairement à ce qu'on observe au locus ribosomique, l'enrichissement de H2A.Z aux promoteurs de ces gènes ne réduit pas, mais augmente de 300 à 500% chez les cellules stimulées à la rapamycine. Étrangement, chez les cellules en phase stationnaire, on observe seulement une faible augmentation allant de 10 à 100%, selon les gènes. Le variant d'histone H2A.Z est donc présent au promoteur de tous les gènes de protéines ribosomique testés, mais son enrichissement semble davantage corrélér avec l'absence d'activité traductionnelle induite par la stimulation à la rapamycine.

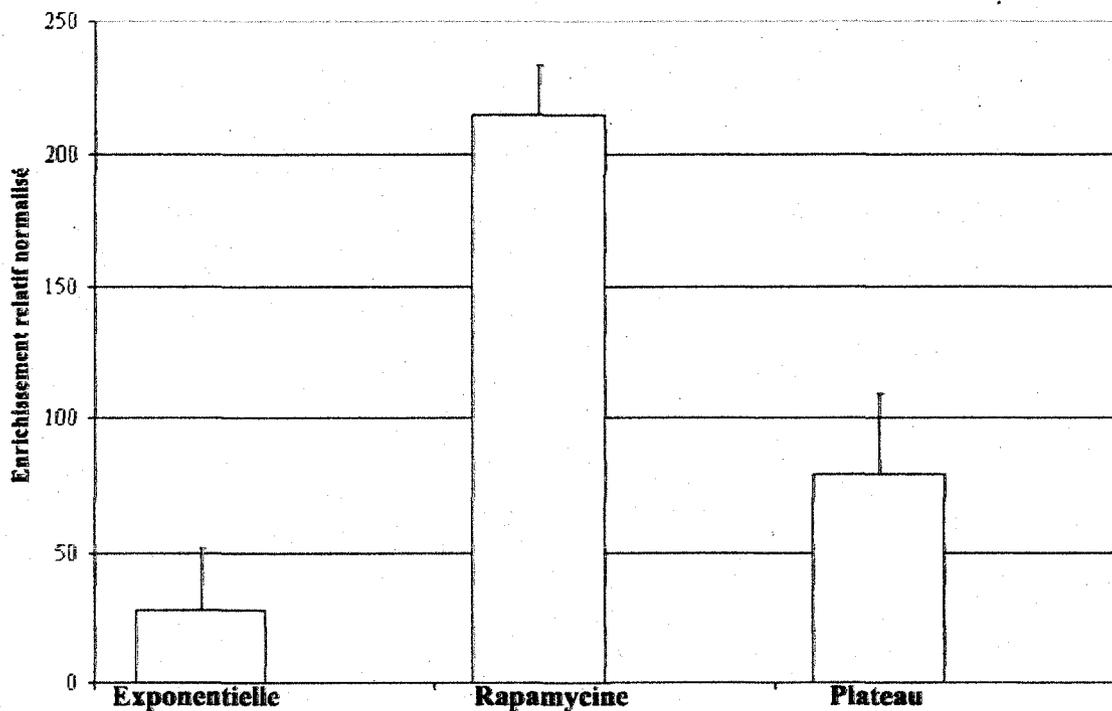


Figure 15. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène *RPS18B* selon l'état de croissance. L'enrichissement de H2A.Z a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à H2A.Z et normalisée sur l'enrichissement de H2B au même site. L'enrichissement a été déterminé au promoteur du gène *RPS18B*. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0), sur des cellules en arrêt de croissance (60 minutes de traitement à la rapamycine à 0,1 µg/ml) ou en condition plateau (DO 600 nm +16 heures de croissances). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de H2A.Z et un anticorps dirigé contre l'étiquette HA de H2B.

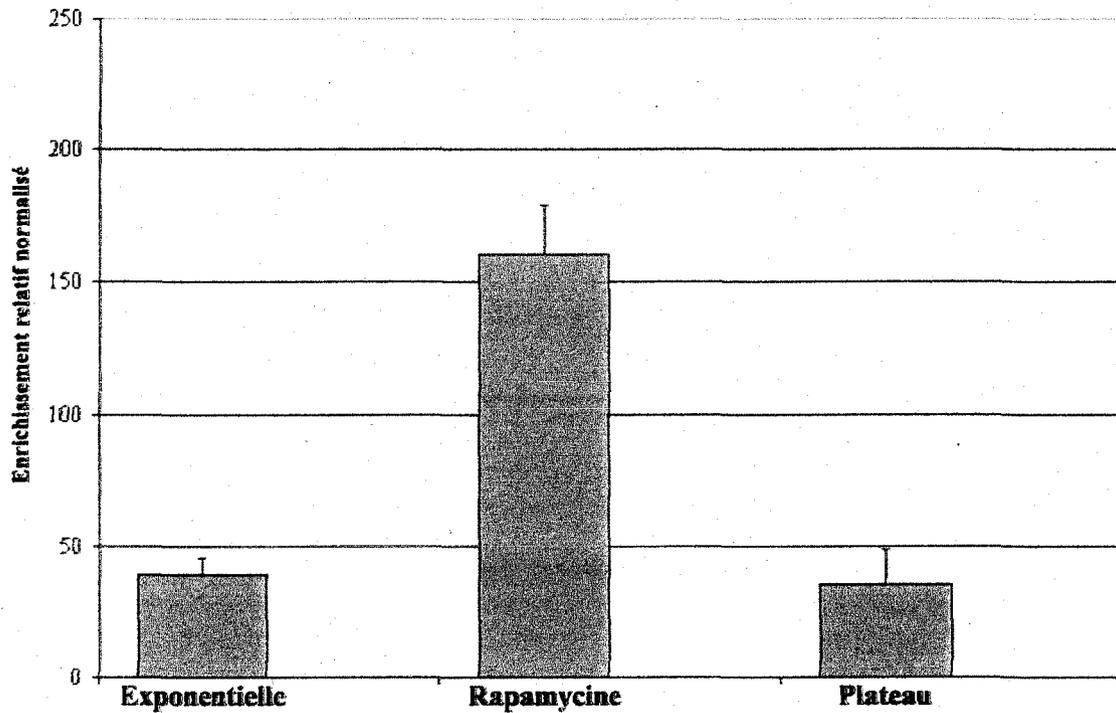


Figure 16. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène *RPS21* selon l'état de croissance. L'enrichissement de H2A.Z a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à H2A.Z et normalisée sur l'enrichissement de H2B au même site. L'enrichissement a été déterminé au promoteur du gène *RPS21*. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0), sur des cellules en arrêt de croissance (60 minutes de traitement à la rapamycine à 0,1 µg/ml) ou en condition plateau (DO 600 nm +16 heures de croissances). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de H2A.Z et un anticorps dirigé contre l'étiquette HA de H2B.

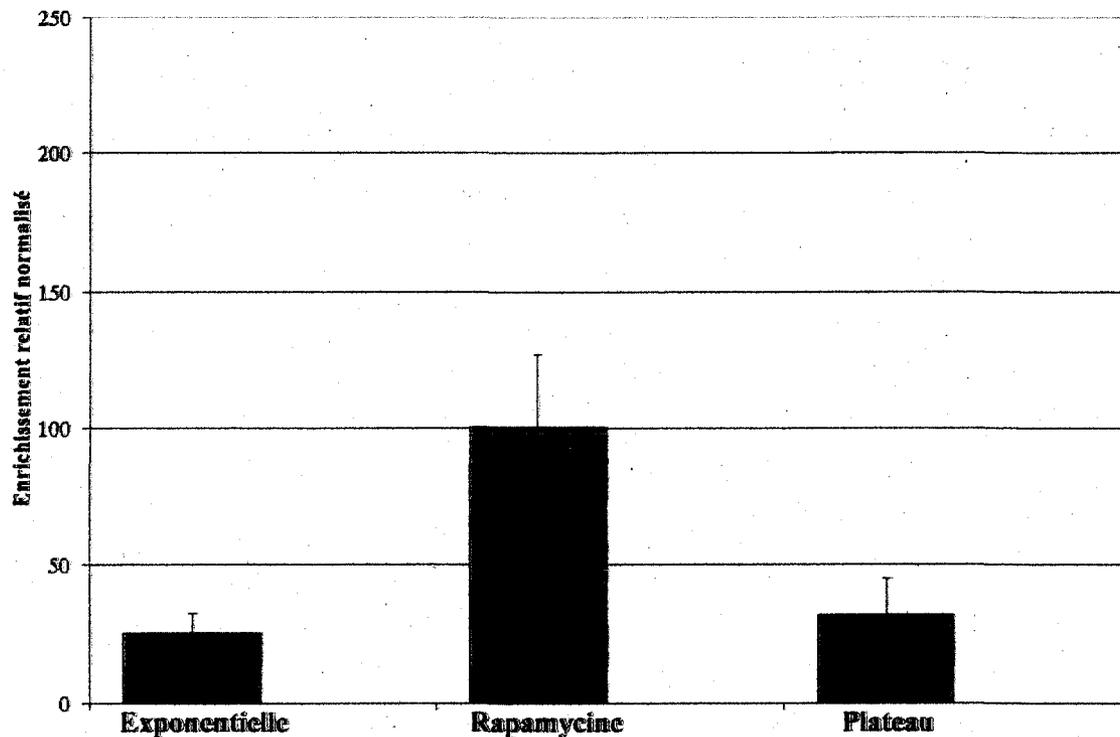


Figure 17. Enrichissement en H2A.Z au promoteur du gène *RPS22B* selon l'état de croissance. L'enrichissement de H2A.Z a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à H2A.Z et normalisée sur l'enrichissement de H2B au même site. L'enrichissement a été déterminé au promoteur du gène *RPS22B*. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0), sur des cellules en arrêt de croissance (60 minutes de traitement à la rapamycine à 0,1 µg/ml) ou en condition plateau (DO 600 nm +16 heures de croissances). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de H2A.Z et un anticorps dirigé contre l'étiquette HA de H2B.

3.2.3 DÉLÉTION DU VARIANT D'HISTONE H2A.Z

Afin d'étudier l'impact de la présence du variant d'histone H2A.Z sur la transcription de classe I au locus ribosomique, nous avons mis la main sur une souche MAY424, souche où le gène *HTZ1* fut supprimé. Cette souche, gracieusement fournie par le laboratoire du docteur Luc Gaudreau, est la même que celle utilisée pour des publications précédentes (Adam et al., 2001).

Afin de mesurer l'effet que l'absence de H2A.Z a sur la transcription du gène d'ARNr 35S, nous avons mesuré et comparé le niveau d'ARN issu de la transcription du gène d'intérêt

dans chaque souche. La partie ARN des ribosomes étant d'une très grande stabilité, nous avons dû procéder de façon particulière pour différencier l'ARNr nouvellement synthétisé de l'ARNr ultra-abondant des ribosomes. Afin de mesurer l'effet sur la transcription du gène ribosomique, nous avons fait nos mesures sur le transcrit immature du gène d'ARNr 35S. En effet, tel que résumé à la figure 18, plusieurs fragments du transcrit original sont épissés pendant la maturation de celui-ci. Ces fragments n'étant que brièvement présents, ils représentent une cible de choix pour mesurer le niveau d'expression du gène d'ARNr 35S. Tel que représenté en rouge à la figure 18, nous avons utilisé des amorces (#137 et 138) ciblant la séquence ETS, rapidement épissée. La normalisation a été réalisée en utilisant l'ARNm du gène de maintien *ACT1* comme contrôle. Après l'extraction d'ARN total et la transcription inverse, on observe une chute du niveau d'expression du gène d'ARNr 35S de 25 à 30% dans la souche $\Delta htz1$. L'absence du variant d'histone H2A.Z entraîne donc une réduction faible mais reproductible du niveau de transcription du gène d'ARNr 35S.

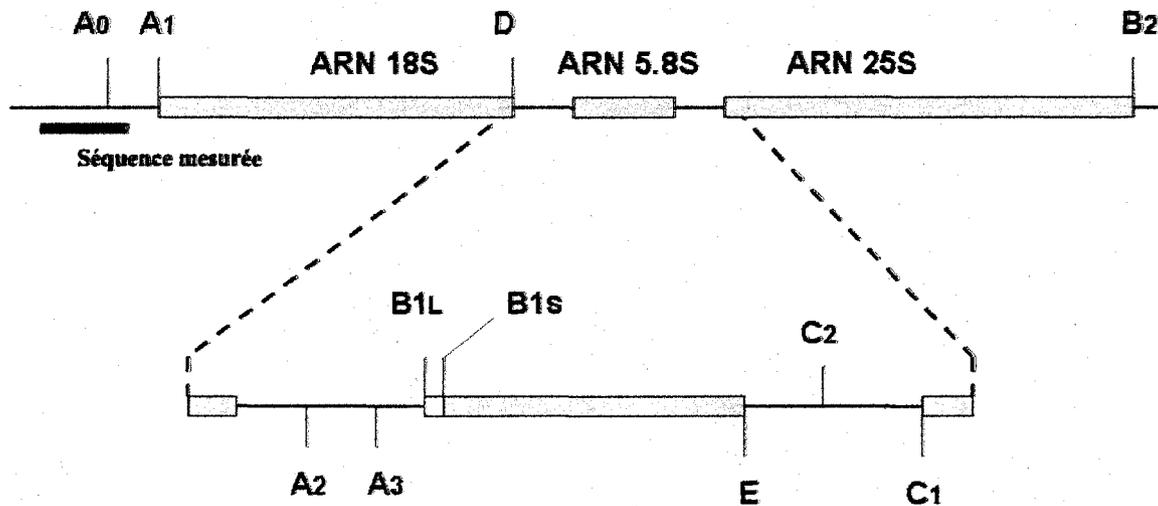


Figure 18. Mesure de la nouvelle transcription de classe I.

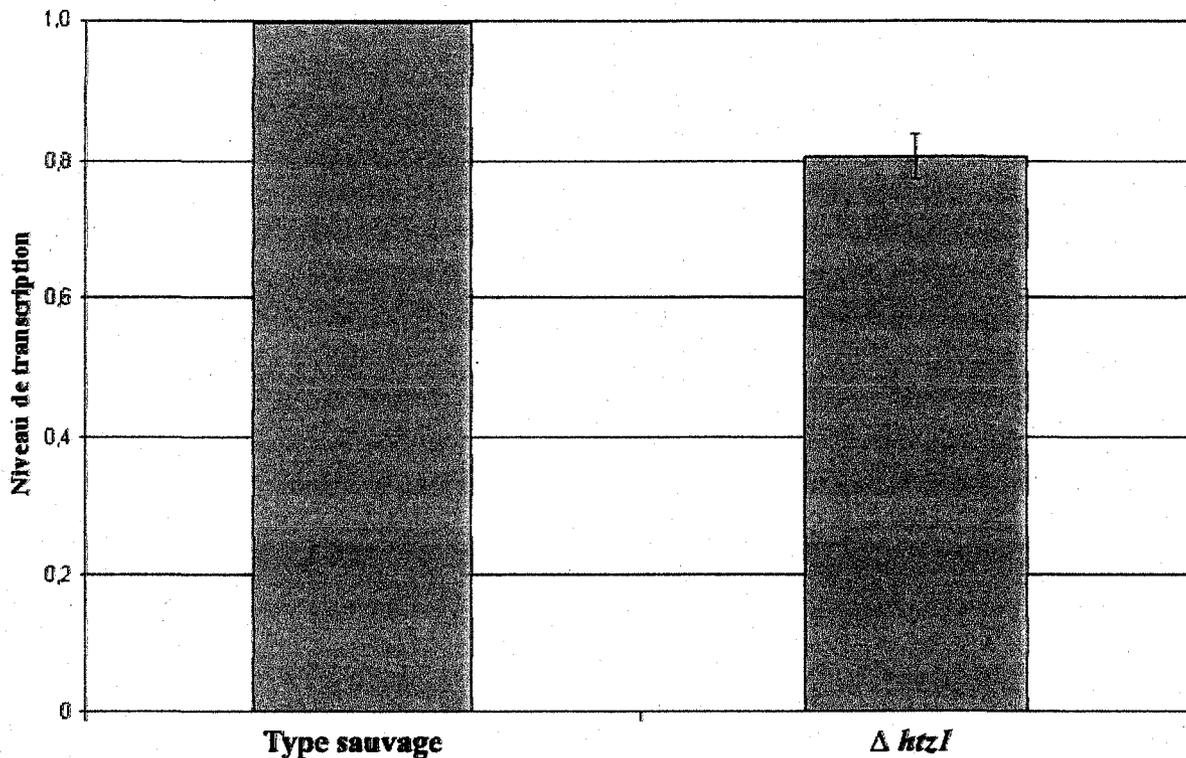


Figure 19. Effet de la délétion du gène *HTZ1* sur la transcription de classe I. L'effet de la délétion du gène *HTZ1* sur la transcription de classe I a été évalué par RT-PCR. L'ARN total de cellules de type sauvage ou $\Delta htz1$ a été extrait et a servi à la synthèse d'ADNc. Le niveau de nouveaux transcrits d'ARN 35S a été mesuré par PCR en temps réel.

3.2.4 DISTRIBUTION ET COMPORTEMENT DANS UNE SOUCHE PSW

Nos résultats suggèrent que l'enrichissement du variant d'histone H2A.Z au niveau du promoteur du gène d'ARNr 35S corrèle avec l'activité transcriptionnelle au locus ribosomique. Nous nous sommes demandés si la machinerie transcriptionnelle de classe I pouvait participer à l'enrichissement du variant H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique.

Nous avons donc utilisé une souche PSW (voir tableau 3). Cette souche haploïde, créée dans le laboratoire du docteur Masayasu Nomura, est basée sur une souche W303 et son gène *RRN9* a été supprimé. L'élimination du gène *RRN9* a permis l'établissement d'un phénotype

de changement de polymérase. Sous ce phénotype, le travail normalement accompli par la machinerie transcriptionnelle de classe I est réalisé par celle de classe II. Cette souche représente donc un contexte idéal pour mesurer l'impact de la machinerie transcriptionnelle sur la déposition du variant H2A.Z.

À partir de la souche PSW, nous avons tout d'abord généré par recombinaison homologue la souche PSWZ (voir tableau 3). Cette nouvelle souche, à l'image des souches utilisées dans les expériences précédentes, exprime une étiquette MYC dans la partie C-ter de la protéine H2A.Z. Nous avons ensuite utilisée cette souche pour déterminer quel sera l'effet de la disparition de la machinerie transcriptionnelle de classe I sur la distribution et le comportement de H2A.Z au locus ribosomique.

Comme sur les autres souches, nous avons procédé par immunoprécipitation de la chromatine. Nous avons commencé par immunoprécipiter la chromatine associée au variant H2A.Z dans la souche PSWZ. Nous avons ensuite répété l'expérience sur des cellules traitées à la rapamycine. Nous avons été surpris de constater que même dans la souche PSWZ, l'enrichissement en variant en variant H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique est réduit de plus de 60% chez des cellules traitées à la rapamycine. Même en l'absence de la machinerie transcriptionnelle de classe I, la présence du variant d'histone H2A.Z semble corrélérer avec l'activité transcriptionnelle au locus ribosomique.

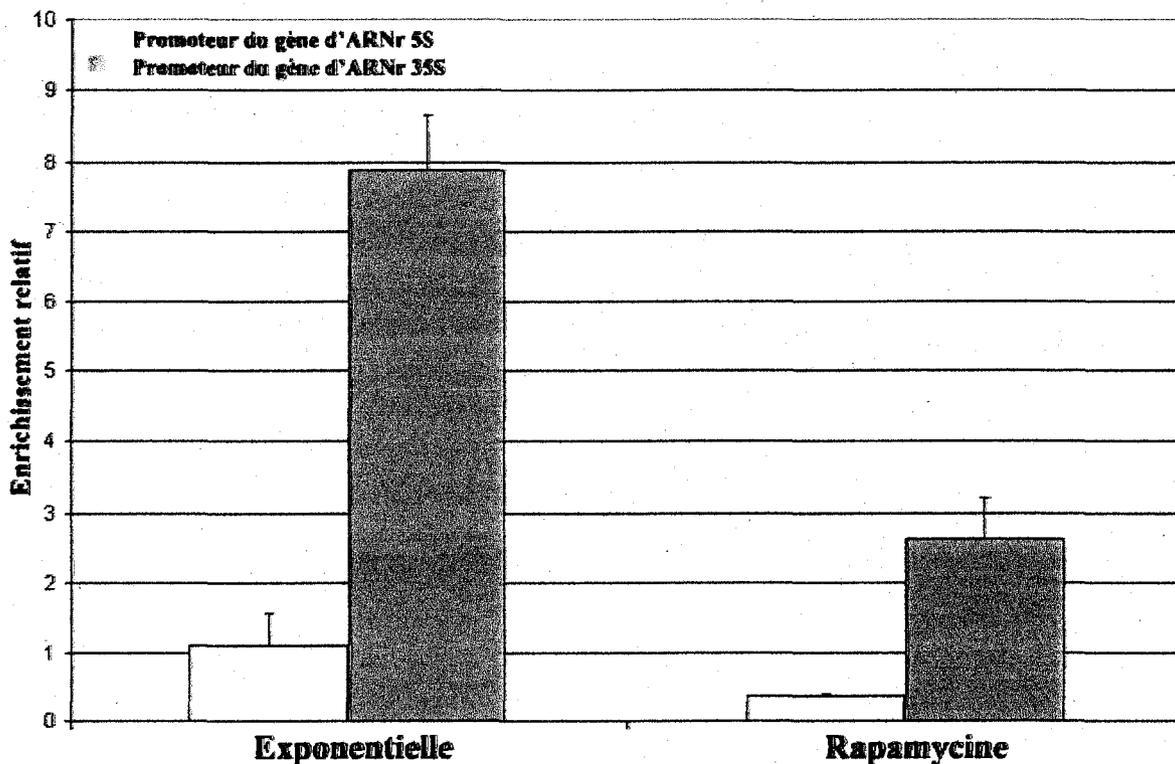


Figure 20. Enrichissement de H2A.Z aux promoteurs du locus ribosomique dans une souche PSW de *Saccharomyces cerevisiae*. L'enrichissement de H2A.Z a été déterminé par immunoprécipitation de la chromatine associée à H2A.Z et normalisée sur l'enrichissement de H3 aux mêmes sites. L'enrichissement a été déterminé au promoteur des gènes d'ARNr 5S et 35S. L'essai a été réalisé sur des cellules en croissance exponentielle (DO 600 nm à 1,0) ou sur des cellules en arrêt de croissance (120 minutes de traitement à la rapamycine à 0,1 µg/ml). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette MYC de H2A.Z et un anticorps dirigé contre H3.

3.2.5 ASSOCIATION DIRECTE PAR RÉTICULATION AU PSORALEN

Les résultats obtenus par immunoprécipitation de la chromatine permettent d'établir une corrélation entre la présence du variant d'histone H2A.Z et l'état transcriptionnel. Néanmoins, cette corrélation n'est pas une démonstration directe puisqu'elle n'élimine pas toutes les autres possibilités. L'idéal serait de pouvoir démontrer directement avec quel(s) état(s) transcriptionnel(s) est associé le variant d'histone H2A.Z. Tel que mentionné précédemment, la technique de réticulation au psoralen développée par José Sogo et Antonio Conconi permet de faire cette démonstration (Conconi et al., 1984). Nous avons donc

cherché à utiliser cette technique pour associer l'enrichissement observé en variant H2A.Z au promoteur du gène ribosomique à un état transcriptionnel.

Nous avons donc initialement cherché à répéter l'expérience de José Sogo. Pour déterminer l'état transcriptionnel du locus ribosomique, nous le digérons avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (dont les cibles sont identifiées à la figure 21) puis nous observons la migration d'un fragment précis en utilisant une sonde radiomarquée. Comme on peut le voir à la figure 21, après de nombreux essais infructueux et beaucoup de mise au point nous sommes parvenus à observer les deux formes chromatiniennes associées aux différents états transcriptionnels. La migration produit une seule bande chez l'ADN contrôle non réticulé, alors que l'on observe deux formes différentes migrant plus lentement chez l'échantillon réticulé. Ces deux formes correspondent aux deux états chromatiniens différents du site. La chromatine plus ouverte et transcrite est également plus accessible à la réticulation au psoralen (Conconi et al., 1989). Cette accessibilité accrue cause un plus haut niveau de réticulation et un plus grand retard sur gel que la forme non transcrite qui correspond ainsi à la bande du bas.

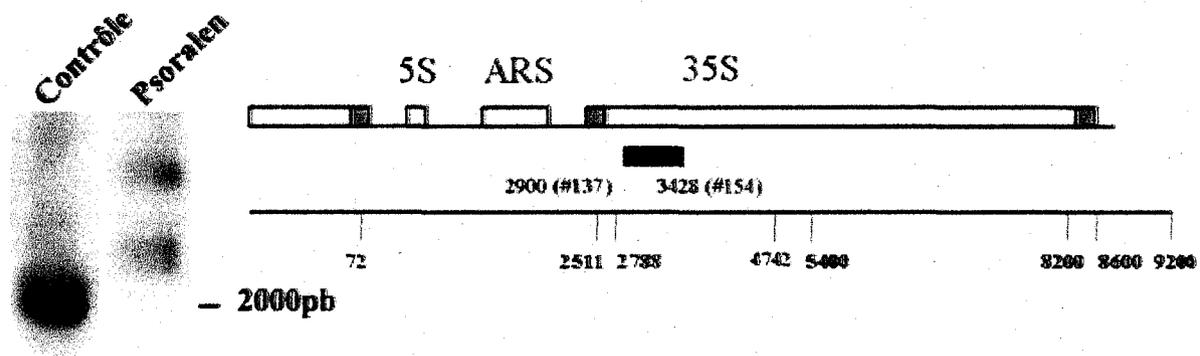


Figure 21. Réticulation au psoralen.

Forts de ce succès, nous avons donc tenté de coupler l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine associée au variant d'histone H2A.Z à la réticulation de l'ADN au psoralen afin de voir ce qu'il en est niveau du promoteur ribosomique (en utilisant une sonde différente). Malheureusement, malgré plusieurs expériences prometteuses de mise au point,

les résultats obtenus ne parviennent pas même à donner un signal. On peut évidemment penser que ce problème est dû à la limite dans la sensibilité de détection de la technique. Compte tenu de la longueur et de la complexité du protocole à réaliser ce résultat n'est malheureusement pas très surprenant.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Hmo1p, PROTÉINE À BOÎTE HMG DE CLASSE B

Chez les mammifères, on sait depuis longtemps que la protéine UBF joue un rôle central dans la transcription ribosomique. Cette protéine n'en demeure pas moins absente du protéome de *Saccharomyces cerevisiae*. En plus d'entraîner une stimulation importante de la transcription de classe I, la protéine UBF est également connue pour jouer un rôle sur la structure de la chromatine au locus ribosomique, avec une mention particulière pour le promoteur du gène ribosomique. Chez la levure, la stimulation de la transcription de classe I est due au complexe UAF; on le considère donc comme l'équivalent fonctionnel de la protéine UBF. Chose étrange, aucune des sous-unités de ce complexe ne possède d'homologie de séquence avec la protéine UBF. Qui plus est, à ce jour, on n'a toujours découvert aucun rôle structural pour le complexe UAF. Le recoupement des fonctions avec la protéine UBF étant incomplet, on évoque depuis quelques années la possibilité qu'un autre facteur vienne compléter le rôle du complexe UAF chez la levure. La protéine Hmo1p, connue pour son interaction avec la machinerie transcriptionnelle de classe I et possédant en plus une homologie de structure avec la protéine UBF, fut évidemment parmi les premières évoquées. C'est donc dans ce contexte prometteur que nous nous sommes intéressés à la protéine Hmo1p.

Appuyé par une abondante littérature sur UBF, il est aisé de comparer les caractéristiques qu'elle partage avec la protéine Hmo1p. Il fut notamment démontré que la protéine UBF interagit de façon très précise avec le promoteur du gène ribosomique chez *Xenopus laevis* (Bazett-Jones et al., 1994). Au surplus, l'interaction d'UBF avec le promoteur se fait via ses trois premières boîtes HMG (Stefanovsky et al., 1996), boîtes possédant une forte homologie avec celles de la protéine Hmo1p (Gadal et al., 2002). Nous savons également qu'UBF

interagit avec le promoteur sous forme de dimères (McStay et al., 1991), dimères qui pourraient aussi être formés par Hmo1p via sa partie C-ter (Dolinski et Heitman, 1999; Lu et al., 1996). L'interaction d'UBF au promoteur impliquant en plus le volet structurel de la protéine, il s'agit d'un cas d'un intérêt exceptionnel pour étudier, par comparaison, le rôle de la protéine Hmo1p chez la levure. Nous avons donc commencé par vérifier l'interaction de la protéine Hmo1p avec le promoteur du gène ribosomique 35S par empreinte à la DNase I. Les résultats obtenus (voir la figure 12) indiquent qu'en conditions *in vitro*, la protéine Hmo1p n'entraîne pas de protection de séquences précises du promoteur et donc que son interaction avec le promoteur semble se faire de façon non spécifique. Ce résultat est pourtant crédible puisque les protéines à boîtes HMG de classe B vont généralement interagir à l'ADN de façon indépendante à la séquence; les protéines Hmgb1p et Hgm2bp en sont d'ailleurs des exemples (Bustin et Reeves, 1996).

La protéine UBF est également connue pour être distribuée sur l'ensemble du locus ribosomique (O'Sullivan et al., 2002). Nous avons donc vérifié si la protéine Hmo1p possédait une affinité particulière pour le locus ribosomique. En premier lieu, nous avons utilisé la technique de retardement sur gel pour étudier l'affinité de la protéine Hmo1p avec plusieurs sondes issues du locus ribosomique. Les résultats obtenus (voir la figure 13) confirment la capacité de Hmo1p à lier l'ADN nu. Toutefois, Hmo1p ne démontre pas d'affinité particulière pour le promoteur du gène ribosomique 35S ou aucune autre sonde testée. Ce manque de spécificité de Hmo1p pour le promoteur, ou tout autre séquence, va dans la même direction que les résultats obtenus par empreinte à la DNase I. Ces observations sont également appuyées par un article de (Kamau et al., 2004). Cet article signale également qu'en conditions *in vitro*, Hmo1p lie l'ADN de façon indépendante à la séquence primaire tout en démontrant une affinité pour des structures secondaires.

Tous ces éléments réunis suggèrent une implication différente de UBF et de Hmo1p dans la régulation de la transcription ribosomique. Hmo1p pourrait se limiter à jouer un rôle de facteur de structure ou a tout le moins de jouer un rôle bien moins central dans la régulation

de la transcription ribosomique. Ces expériences ayant été réalisées en contexte *in vitro*, elles ne nous permettent toutefois pas d'exclure une distribution différente en contexte *in vivo*.

Nous sommes ensuite allés voir de quelle manière se comporte Hmo1p au niveau du génome. Nous avons donc utilisé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pour étudier sa distribution et son comportement au locus ribosomique. Les résultats obtenus (voir figure 11) nous indiquent un certain enrichissement de la protéine au niveau du régulateur d'expansion, de même qu'au niveau du promoteur du gène ribosomique 35S. Cette distribution de Hmo1p dans l'espace intergénique sera plus tard confirmée par le groupe de Kevin Struhl (Hall et al., 2006). La répétition de cette expérience sur des cellules traitées à la rapamycine n'entraîne pas de variation dans l'enrichissement de Hmo1p aux sites testés. Puisque le traitement à la rapamycine réprime fortement la transcription de classe I (Claypool et al., 2004; Powers et Walter, 1999), notre interprétation de ces résultats était qu'il n'y a pas de corrélation entre l'enrichissement en Hmo1p et l'activité transcriptionnelle au locus ribosomique. Cette observation étant cohérente avec les résultats obtenus *in vitro*, nous avons conclu que Hmo1p ne se comporte pas comme la protéine UBF au niveau du promoteur du gène ribosomique et qu'elle ne semble pas impliquée dans la régulation de la transcription de ce gène. Son manque apparent de spécificité pour une séquence particulière évoque la possibilité qu'il s'agisse d'un facteur général de chromatine indirectement impliqué dans la régulation de la transcription de classe I. Cette dernière possibilité est d'autant plus crédible que d'autres protéines à boîte HMG de classe B agissent ainsi. En effet, d'autres protéines de ce groupe, citons ici en exemple Hmg1p et Hmg2p, se lient à l'ADN sans égard à la séquence primaire, présentant toutefois une préférence marquée pour des structures secondaires comme l'ADN en « four way junctions » (Bustin et Reeves, 1996).

4.2 Hmo1p, PROTÉINE COORDINATRICE

Deux articles majeurs ensuite publiés par les groupes de Kevin Struhl et Olivier Gadgil nous amenèrent néanmoins à réviser en partie les conclusions initialement tirées. Comme nous

l'avons conclu, Hmo1p ne se comporte effectivement pas comme la protéine UBF au niveau du promoteur du gène ribosomique ou dans la régulation de la transcription de classe I. (Hall et al., 2006; Kamau et al., 2004) conclurent également du manque de spécificité de séquence de Hmo1p. Toutefois, ils déterminèrent qu'*in vivo* cette dernière se trouve essentiellement distribuée aux promoteurs des gènes « RP » et dans une moindre mesure sur la séquence codante du gène d'ARN ribosomique 35S (Berger et al., 2007; Hall et al., 2006). Étant donné que Rap1p est constitutivement présente aux promoteurs « RP » (Reid et al., 2000), la fonction de Hmo1p y serait de permettre la régulation de leur expression en fonction de la disponibilité des ressources nutritives. On ne connaît toutefois rien du mécanisme régulant sa présence à ces promoteurs, si ce n'est qu'il implique la voie TOR (Berger et al., 2007). On suggère finalement que sa présence au niveau de la séquence codante du gène ribosomique 35S soit impliquée dans la régulation de l'élongation du transcrit, rôle récemment évoqué pour UBF (Stefanovsky et al., 2006).

4.3 H2A.Z DANS LA BIOSYNTHÈSE DES RIBOSOMES

En 2005, un article du groupe de Luc Gaudreau étudiant la distribution génomique du variant d'histone H2A.Z chez *Saccharomyces cerevisiae* signale notamment sa présence au locus ribosomique. Puisque l'implication d'un variant d'histone dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes est quelque chose de complètement nouveau, nous y avons accordé un grand intérêt.

Nous avons commencé par reconfirmer la présence du variant d'histone H2A.Z au locus ribosomique. Comme on peut le voir à la figure 14, nous avons également observé un enrichissement du variant d'histone H2A.Z légèrement en amont des promoteurs des gènes d'ARNr 5S et 35S. On note également que l'enrichissement au promoteur du gène ribosomique 35S est significativement plus élevé qu'au niveau du promoteur 5S. Ce résultat, bien qu'intéressant, est peu surprenant puisqu'on observe la présence de ce variant d'histone à 63% des promoteurs du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (Guillemette et al., 2005). Au

surplus, on trouve un élément de liaison à Reb1p légèrement en amont du promoteur d'ARNr 35S, élément dont la présence est connue pour faciliter la déposition de l'histone H2A.Z à sa proximité (Raisner et al., 2005). La présence de l'élément Reb1 au promoteur du gène ribosomique 35S et non au gène 5S pourrait d'ailleurs expliquer la différence entre les niveaux d'enrichissement à ces sites.

D'après les observations faites au gène modèle *GALI* chez la levure, la présence du variant H2A.Z au promoteur est nécessaire à l'activation de la transcription. Malgré tout, ce dernier est expulsé au cours de l'activation et se voit donc généralement associé à la forme transcriptionnellement éteinte du gène (Adam et al., 2001; Laroche et Gaudreau, 2003). Au locus ribosomique, les deux états transcriptionnels différents du gène d'ARNr 35 S corréleront avec l'eucromatine ou l'hétérochromatine. Sachant qu'en 2005 le groupe de Hiten Madhani signale la présence du variant H2A.Z surtout dans l'euchromatine en amont de gènes actifs et inactifs (Raisner et al., 2005), nous nous sommes demandés comment serait distribué ce dernier au locus ribosomique. Étant donné la difficulté technique de distinguer les deux états chromatiniques au locus ribosomique, nous avons donc répété l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine associée au variant H2A.Z sur des cellules traitées à la rapamycine, ainsi que sur des cellules en phase stationnaire. Les résultats obtenus (voir la figure 14) montrent une réduction de 50 à 80 % de l'enrichissement en H2A.Z aux promoteurs ribosomiques chez les cellules dont la transcription de classe I est fortement réduite. Ce résultat corréle l'enrichissement du variant d'histone H2A.Z avec l'état euchromatique et transcriptionnellement actif du locus ribosomique. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il cadre bien avec l'idée d'une chromatine particulière au locus ribosomique récemment évoquée dans la littérature.

Chez les mammifères, les travaux d'Ingrid Grummt ont démontré que sous certaines conditions, la présence de TTF-I, l'équivalent fonctionnel chez les mammifères de Reb1p, entraîne le déplacement de nucléosomes à proximité du promoteur du gène ribosomique (Nemeth et al., 2004). Une des dispositions possibles des nucléosomes au promoteur corréle

avec l'activité transcriptionnelle du gène en aval (Li et al., 2006b). On sait également qu'au niveau du gène *GAL1* chez *Saccharomyce cerevisiae*, la présence du variant d'histone H2A.Z entraîne une réorganisation locale de la chromatine nécessaire à l'activation de la transcription (Guillemette et al., 2005). On peut donc imaginer que la présence du variant H2A.Z aux promoteurs du locus ribosomique participe à une réorganisation de la chromatine, à proximité des promoteurs, favorable à la transcription au locus ribosomique. Il ne s'agit toutefois pas de la seule possibilité, on pourrait notamment imaginer que le rôle de la présence du variant d'histone H2A.Z au locus ribosomique soit d'arrêter la propagation de l'hétérochromatine en amont d'un gène à transcrire (Meneghini et al., 2003).

Dans un cas comme dans l'autre, la délétion du gène *HTZ1* entraînera inévitablement une chute du niveau de transcription du gène ribosomique. Comme nous savions déjà que la délétion du gène *HTZ1* entraîne un retard significatif dans la croissance chez la levure (Adam et al., 2001), nous avons vérifié l'effet de cette délétion sur le niveau de transcription du gène ribosomique 35S. Comme on peut le voir aux figures 18 et 19, l'absence du variant H2A.Z entraîne une chute d'environ 30 % du niveau de transcription de classe I. Le variant H2A.Z joue donc un rôle au locus ribosomique et ne se contente pas uniquement de corrélérer avec la transcription de classe I.

Deux articles majeurs publiés par Carles et Riva furent publiés en 2006 (Chedin et al., 2007; Laferte et al., 2006). Leur principale conclusion est que la transcription de classe I au locus ribosomique est en amont dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes, notamment de la régulation de la transcription des gènes « RP ». Ayant remarqué l'implication du variant d'histone H2A.Z dans la régulation de la transcription de classe I, nous nous sommes demandés s'il pouvait également avoir un rôle dans la régulation de la transcription des gènes « RP » et peut-être dans la coordination de la biosynthèse des ribosomes. Nous avons donc étudié le comportement du variant H2A.Z aux promoteurs de trois gènes « RP ». Comme on peut le voir aux figures 15, 16 et 17, le variant H2A.Z se voit uniquement enrichi aux promoteurs des gènes « RP » testés chez les cellules traitées à la rapamycine. Contrairement

à ce qu'on observe au locus ribosomique, cet enrichissement du variant aux promoteurs de gènes transcriptionnellement inactifs de classe II correspond beaucoup mieux au modèle de fonctionnement général du variant d'histone H2A.Z (Guillemette et Gaudreau, 2006).

Il est néanmoins étonnant de constater que le niveau d'enrichissement observé chez les cellules en phase stationnaire est inférieur à celui observé chez les cellules traitées à la rapamycine. On pourrait expliquer cette différence par une distinction mécanistique entre la répression induite à la rapamycine et celle induite à la suite d'une longue période de famine. Un article du groupe de Jason Brickner abordant cette distinction entre une répression à court et à long terme implique d'ailleurs le variant H2A.Z dans l'équation (Brickner et al., 2007). Selon Brickner, le variant H2A.Z pourrait également jouer un rôle favorisant une réactivation rapide de la transcription suite à une répression à court terme. Les résultats obtenus dans cet article démontrent d'ailleurs une remarquable similarité avec ceux que nous avons obtenus aux promoteurs des gènes « RP » (voir la figure 22).

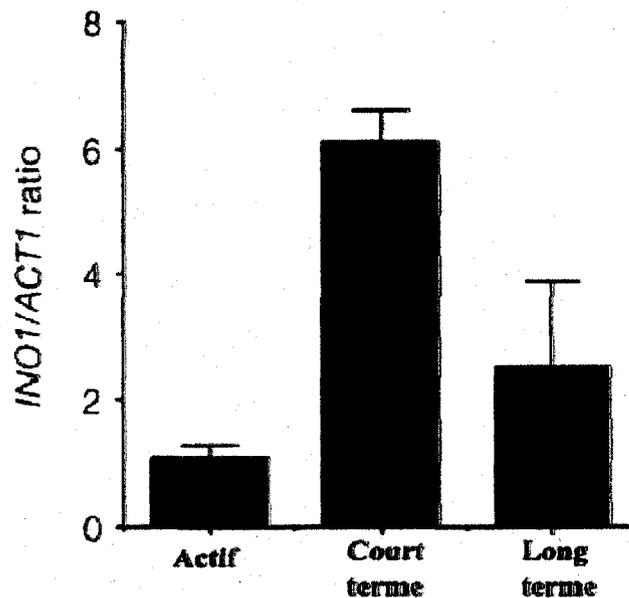


Figure 22. Enrichissement en H2A.Z au promoteur de INO1 selon l'état de croissance (Tiré de Brickner D. 2007).

Malgré les explications partielles avancées par le groupe de Jason Brickner, nous nous sommes demandés ce qui pouvait amener le variant d'histone H2A.Z à adopter un « comportement » si différent du locus ribosomique aux gènes « RP ». Ne sachant toujours pas précisément ce qui entraîne la déposition du variant H2A.Z au niveau des promoteurs, nous avons porté notre intérêt sur le rôle de la machinerie transcriptionnelle. La principale possibilité venant à l'esprit pour expliquer cette différence de comportement est l'existence d'une chromatine ribosomique dont les particularités locales entraîneraient notamment le variant H2A.Z à être associé à une chromatine transcrite plutôt qu'éteinte. Bien qu'on ne dispose toujours pas de preuve directe soutenant l'existence d'une chromatine ribosomique, on sait que les télomères et les loci HML et HMR possèdent quand à eux de fortes particularités locales, notamment au niveau du comportement de l'histone désacetylase Sir2p (Moazed, 2001).

La principale question demeure à savoir quelles sont ces différences locales de la chromatine qui entraîneraient le variant H2A.Z à prendre un comportement différent de celui observé aux gènes « RP ». La différence la plus marquante entre les loci des gènes « RP » et le locus ribosomique demeure la nature de la machinerie transcriptionnelle. Comme l'arrivée de la machinerie transcriptionnelle au locus pourrait entraîner des modifications locales à la chromatine ou encore à la déposition de certaines histones, nous y avons porté un grand intérêt.

Utilisant une souche PSW, nous avons étudié le comportement du variant d'histone H2A.Z au locus ribosomique en absence de machinerie transcriptionnelle de classe I. Les résultats obtenus, présentés à la figure 20, indiquent que le remplacement de la machinerie transcriptionnelle de classe I par celle de classe II n'entraîne pas de changement dans le « comportement » du variant H2A.Z. La machinerie transcriptionnelle de classe I n'est donc pas directement responsable du « comportement » du variant H2A.Z au locus ribosomique.

Cette expérience n'étant toutefois pas très exhaustive, elle ne nous permet pas d'identifier un élément pouvant expliquer cette différence dans le « comportement » du variant H2A.Z. Elle nous permet néanmoins de déterminer que si la cause de cette variation de comportement est au niveau de la chromatine, elle est déjà présente avant l'arrivée de la machinerie transcriptionnelle. Plusieurs aspects, certainement moins attrayants mais tout de même possible, demeurent toujours non explorés. On peut par exemple penser à la structure du promoteur d'ARNr 35S qui est très différente de celle d'un promoteur de gène « RP ». On note l'absence de site Rebl aux promoteurs de gènes « RP », alors que l'élément Rapl fait défaut au promoteur du gène ribosomique 35S. Chez les mammifères, l'élément T0, l'équivalent du site Rebl, est connu comme servant de pôle permettant le recrutement d'un complexe de remodelage, d'histones déacétylases et même d'ADN méthyltransférases. La présence ou l'absence d'un tel site ne saurait manquer d'affecter la régulation de la déposition des variants d'histone.

Un changement dans le « comportement » du variant d'histone H2A.Z au locus ribosomique induit par un changement de classe de machinerie transcriptionnelle serait venu confirmer que le variant d'histone est bel et bien associé aux copies transcriptionnellement actives du locus ribosomique. Il faudra toutefois trouver une autre façon de démontrer directement cette association entre le variant d'histone H2A.Z et la partie euchromatique du locus ribosomique.

CONCLUSION

L'objectif général de ce projet était d'étudier l'implication de la régulation de la structure de la chromatine dans la régulation de la transcription au locus ribosomique. Notre premier intérêt était la protéine Hmo1p, connue pour son lien avec la machinerie transcriptionnelle de classe I et son homologie de séquence avec la protéine UBF. Nous avons commencé par étudier le facteur Hmo1p pour voir s'il complétait la fonction du complexe UAF dans la régulation de la transcription de classe I. Les expériences réalisées en contexte *in vitro* ont indiqué que la protéine Hmo1p se peut se lier à l'ADN, mais qu'elle ne démontre aucune spécificité pour la séquence du promoteur ou du locus ribosomique. Nous avons également étudié sa distribution au locus ribosomique par immunoprécipitation de la chromatine. Nous y avons déterminé un certain enrichissement au niveau du promoteur du gène ribosomique, enrichissement non affecté par l'état de croissance de la cellule. Notre conclusion était que le facteur Hmo1p n'entraîne pas la formation de structure pseudo nucléosomale au promoteur ribosomique comme le fait UBF chez les mammifères. Nous concluons également que le facteur Hmo1p ne semble pas avoir de rôle dans la régulation de la transcription au niveau du promoteur du gène d'ARNr 35S. Des travaux subséquents ayant étudié la distribution de Hmo1p sur l'ensemble du génome ont pour leur part conclu que cette protéine joue un rôle de coordination de la transcription des différents gènes « RP » en fonction de la disponibilité des ressources (Hall et al., 2006). Il fut également suggéré que Hmo1p soit aussi impliquée dans régulation de l'élongation du transcrit ribosomique (Berger et al., 2007).

Notre second intérêt dans ce projet fut le variant d'histone H2A.Z. Après la publication par le groupe de Luc Gaudreau de la présence du variant d'histone H2A.Z au niveau des promoteurs du locus ribosomique (Guillemette et al., 2005), nous nous sommes questionnés sur son rôle dans la régulation de la biosynthèse des ribosomes. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine réalisées nous ont permis de corrélérer la présence du variant H2A.Z aux promoteurs du locus ribosomique avec l'activité transcriptionnelle de classe I et dans une moindre mesure de classe III. Nous avons observé que l'absence du

variant H2A.Z entraîne une réduction d'environ 30% du niveau de transcription de classe I. Sa présence va donc au-delà de la simple corrélation et joue un rôle sur la régulation de la transcription de classe I. Nous avons également réalisé qu'au niveau des promoteurs de gènes « RP » l'enrichissement en H2A.Z corréle avec une récente répression de l'activité transcriptionnelle. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine réalisées dans le contexte PSW nous permettent également d'éliminer la différence de machinerie transcriptionnelle comme raison principale de la différence de «comportement» du variant d'histone H2A.Z entre le locus ribosomique et les promoteurs de gènes « RP ». Il s'agit des premiers travaux mettant en lumière l'importance du variant d'histone H2A.Z dans la régulation de la transcription au locus ribosomique. Bien que de nombreux efforts en ce sens furent réalisés, une démonstration plus directe de l'association du variant d'histone H2A.Z avec la forme euchromatique du locus ribosomique demeure néanmoins à réaliser. Une telle association serait un premier indice en faveur d'une chromatine particulière au locus ribosomique.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, M., Robert, F., Laroche, M., et Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* 21, 6270-6279.

Aprikian, P., Moorefield, B., et Reeder, R. H. (2001). New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol Cell Biol* 21, 4847-4855.

Banditt, M., Koller, T., et Sogo, J. M. (1999). Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 4953-4960.

Bazett-Jones, D. P., Leblanc, B., Herfort, M., et Moss, T. (1994). Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264, 1134-1137.

Benguria, A., Hernandez, P., Krimer, D. B., et Schwartzman, J. B. (2003). Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 31, 893-898.

Berger, A. B., Decourty, L., Badis, G., Nehrbass, U., Jacquier, A., et Gadal, O. (2007). Hmo1 is required for TOR-dependent regulation of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol* 27, 8015-8026.

Brickner, D. G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P. C., Widom, J., et Brickner, J. H. (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5, e81.

Buck, S. W., Sandmeier, J. J., et Smith, J. S. (2002). RNA polymerase I propagates unidirectional spreading of rDNA silent chromatin. *Cell* 111, 1003-1014.

Bustin, M., et Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54, 35-100.

Chedin, S., Laferte, A., Hoang, T., Lafontaine, D. L., Riva, M., et Carles, C. (2007). Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle* 6, 11-15.

Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J., et Schreiber, S. L. (1995). Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4947-4951.

Choe, S. Y., Schultz, M. C., et Reeder, R. H. (1992). In vitro definition of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res* 20, 279-285.

Cioci, F., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M., Siddiqi, I. N., et Nomura, M. (2003). Silencing in yeast rDNA chromatin: reciprocal relationship in gene expression between RNA polymerase I and II. *Mol Cell* 12, 135-145.

Clarkson, M. J., Wells, J. R., Gibson, F., Saint, R., et Tremethick, D. J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694-697.

Claypool, J. A., French, S. L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J. A., Beyer, A. L., et Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* 15, 946-956.

Conconi, A., Losa, R., Koller, T., et Sogo, J. M. (1984). Psoralen-crosslinking of soluble and of H1-depleted soluble rat liver chromatin. *J Mol Biol* 178, 920-928.

Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T., et Sogo, J. M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57, 753-761.

Cubizolles, F., Martino, F., Perrod, S., et Gasser, S. M. (2006). A homotrimer-heterotrimer switch in Sir2 structure differentiates rDNA and telomeric silencing. *Mol Cell* 21, 825-836.

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., et Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331-2338.

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., et Sogo, J. M. (1995). Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 15, 5294-5303.

De Winter, R. F., et Moss, T. (1986). The ribosomal spacer in *Xenopus laevis* is transcribed as part of the primary ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 14, 6041-6051.

De Winter, R. F., et Moss, T. (1987). A complex array of sequences enhances ribosomal transcription in *Xenopus laevis*. *J Mol Biol* 196, 813-827.

Dolinski, K. J., et Heitman, J. (1999). Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase. *Genetics* 151, 935-944.

Elion, E. A., et Warner, J. R. (1984). The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream. *Cell* 39, 663-673.

Elion, E. A., et Warner, J. R. (1986). An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 2089-2097.

Evers, R., Smid, A., Rudloff, U., Lottspeich, F., et Grummt, I. (1995). Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *Embo J* 14, 1248-1256.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T. C., Beall, J., Wells, J. R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P. D., Tremethick, D. J., et Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11, 1183-1187.

Fath, S., Milkereit, P., Peyroche, G., Riva, M., Carles, C., et Tschochner, H. (2001). Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptional active RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14334-14339.

Finch, J. T., Noll, M., et Kornberg, R. D. (1975). Electron microscopy of defined lengths of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3320-3322.

French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., et Beyer, A. L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 23, 1558-1568.

Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., et Thuriaux, P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *Embo J* 21, 5498-5507.

Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.

Goldman, W. E., Goldberg, G., Bowman, L. H., Steinmetz, D., et Schlessinger, D. (1983). Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol Cell Biol* 3, 1488-1500.

Granneman, S., et Baserga, S. J. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res* 296, 43-50.

Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N., et Bachellerie, J. P. (1985). Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell* 43, 801-810.

Grummt, I., et Pikaard, C. S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 641-649.

Guillemette, B., Bataille, A. R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., et Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Guillemette, B., et Gaudreau, L. (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 84, 528-535.

- Hall, D. B., Wade, J. T., et Struhl, K. (2006). An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26, 3672-3679.
- Haltiner, M. M., Smale, S. T., et Tjian, R. (1986). Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol* 6, 227-235.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., et Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583-592.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., et Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92-96.
- Huang, J., Brito, I. L., Villen, J., Gygi, S. P., Amon, A., et Moazed, D. (2006). Inhibition of homologous recombination by a cohesin-associated clamp complex recruited to the rDNA recombination enhancer. *Genes Dev* 20, 2887-2901.
- Humphrey, E. L., Shamji, A. F., Bernstein, B. E., et Schreiber, S. L. (2004). Rpd3p relocation mediates a transcriptional response to rapamycin in yeast. *Chem Biol* 11, 295-299.
- Idrissi, F. Z., et Pina, B. (1999). Functional divergence between the half-sites of the DNA-binding sequence for the yeast transcriptional regulator Rap1p. *Biochem J* 341 (Pt 3), 477-482.
- Jackson, J. D., Falciano, V. T., et Gorovsky, M. A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci* 21, 466-467.
- Jansa, P., Mason, S. W., Hoffmann-Rohrer, U., et Grummt, I. (1998). Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *Embo J* 17, 2855-2864.
- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R. C., Workman, J. L., Conaway, J. W., et Kusch, T. (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30, 680-687.
- Johnson, S. P., et Warner, J. R. (1989). Unusual enhancer function in yeast rRNA transcription. *Mol Cell Biol* 9, 4986-4993.
- Jones, H. S., Kawauchi, J., Braglia, P., Alen, C. M., Kent, N. A., et Proudfoot, N. J. (2007). RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nat Struct Mol Biol* 14, 123-130.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., et Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9, 1559-1571.

- Kamakaka, R. T., et Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19, 295-310.
- Kamau, E., Bauerle, K. T., et Grove, A. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group box protein HMO1 contains two functional DNA binding domains. *J Biol Chem* 279, 55234-55240.
- Karpen, G. H., Schaefer, J. E., et Laird, C. D. (1988). A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev* 2, 1745-1763.
- Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K., et Kokubo, T. (2007). Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 6686-6705.
- Keener, J., Josaitis, C. A., Dodd, J. A., et Nomura, M. (1998). Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription in vitro from purified components. TATA-binding protein is not required for basal transcription. *J Biol Chem* 273, 33795-33802.
- Keys, D. A., Lee, B. S., Dodd, J. A., Nguyen, T. T., Vu, L., Fantino, E., Burson, L. M., Nogi, Y., et Nomura, M. (1996). Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes Dev* 10, 887-903.
- Keys, D. A., Vu, L., Steffan, J. S., Dodd, J. A., Yamamoto, R. T., Nogi, Y., et Nomura, M. (1994). RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2349-2362.
- Kief, D. R., et Warner, J. R. (1981). Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1, 1007-1015.
- Kobor, M. S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M. D., Gin, J. W., Jennings, J. L., Link, A. J., Madhani, H. D., et Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131.
- Kornberg, R. D., et Lorch, Y. (1992). Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol* 8, 563-587.
- Kornberg, R. D., et Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865-868.
- Krogan, N. J., Baetz, K., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T. C., Thompson, N. J., Davey, M. G., Pootoolal, J., Hughes, T. R., et al. (2004). Regulation of chromosome stability

by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13513-13518.

Kuhn, A., Bartsch, I., et Grummt, I. (1990). Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases. *Nature* 344, 559-562.

Kulkens, T., van der Sande, C. A., Dekker, A. F., van Heerikhuizen, H., et Planta, R. J. (1992). A system to study transcription by yeast RNA polymerase I within the chromosomal context: functional analysis of the ribosomal DNA enhancer and the RBP1/REB1 binding sites. *Embo J* 11, 4665-4674.

Kulkens, T., van Heerikhuizen, H., Klootwijk, J., Oliemans, J., et Planta, R. J. (1989). A yeast ribosomal DNA-binding protein that binds to the rDNA enhancer and also close to the site of Pol I transcription initiation is not important for enhancer functioning. *Curr Genet* 16, 351-359.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., 3rd, Abmayr, S. M., Washburn, M. P., et Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-2087.

Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., et Chedin, S. (2006). The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* 20, 2030-2040.

Lang, W. H., et Reeder, R. H. (1995). Transcription termination of RNA polymerase I due to a T-rich element interacting with Reb1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9781-9785.

Langst, G., Becker, P. B., et Grummt, I. (1998). TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *Embo J* 17, 3135-3145.

Larochelle, M., et Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *Embo J* 22, 4512-4522.

Leach, T. J., Mazzeo, M., Chotkowski, H. L., Madigan, J. P., Wotring, M. G., et Glaser, R. L. (2000). Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275, 23267-23272.

Li, B., Nierras, C. R., et Warner, J. R. (1999). Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Mol Cell Biol* 19, 5393-5404.

Li, H., Tsang, C. K., Watkins, M., Bertram, P. G., et Zheng, X. F. (2006a). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442, 1058-1061.

Li, J., Langst, G., et Grummt, I. (2006b). NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *Embo J* 25, 5735-5741.

Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M., et Yates, J. R., 3rd (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* *17*, 676-682.

Long, E. O., et Dawid, I. B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* *49*, 727-764.

Lu, J., Kobayashi, R., et Brill, S. J. (1996). Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *J Biol Chem* *271*, 33678-33685.

Lucchini, R., Pauli, U., Braun, R., Koller, T., et Sogo, J. M. (1987). Structure of the extrachromosomal ribosomal RNA chromatin of *Physarum polycephalum*. *J Mol Biol* *196*, 829-843.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., et Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.

Mason, S. W., Sander, E. E., et Grummt, I. (1997). Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *Embo J* *16*, 163-172.

Matangkasombut, O., et Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* *11*, 353-363.

McStay, B., Frazier, M. W., et Reeder, R. H. (1991). xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* *5*, 1957-1968.

McStay, B., et Reeder, R. H. (1990). An RNA polymerase I termination site can stimulate the adjacent ribosomal gene promoter by two distinct mechanisms in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* *4*, 1240-1251.

Meneghini, M. D., Wu, M., et Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* *112*, 725-736.

Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K., et Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* *20*, 711-722.

Mitchelson, K., et Moss, T. (1987). The enhancement of ribosomal transcription by the recycling of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* *15*, 9577-9596.

Miyoshi, K., Miyakawa, T., et Mizuta, K. (2001). Repression of rRNA synthesis due to a secretory defect requires the C-terminal silencing domain of Rap1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *29*, 3297-3303.

- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S., et Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell* 8, 489-498.
- Morrow, B. E., Johnson, S. P., et Warner, J. R. (1989). Proteins that bind to the yeast rDNA enhancer. *J Biol Chem* 264, 9061-9068.
- Morse, R. H. (2000). RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends Genet* 16, 51-53.
- Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* 14, 210-217.
- Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., et Stefanovsky, V. (2007). A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64, 29-49.
- Moss, T., Larose, A. M., Mitchelson, K., et Leblanc, B. (1992). Readthrough enhancement and promoter occlusion on the ribosomal genes of *Xenopus laevis*. *Biochem Cell Biol* 70, 324-331.
- Moss, T., et Stefanovsky, V. Y. (1995). Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50, 25-66.
- Moss, T., et Stefanovsky, V. Y. (2002). At the center of eukaryotic life. *Cell* 109, 545-548.
- Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A., et Sollner-Webb, B. (1993). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* 7, 1609-1619.
- Musters, W., Knol, J., Maas, P., Dekker, A. F., van Heerikhuizen, H., et Planta, R. J. (1989). Linker scanning of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res* 17, 9661-9678.
- Nemeth, A., Strohner, R., Grummt, I., et Langst, G. (2004). The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes in vivo. *Nucleic Acids Res* 32, 4091-4099.
- Neuman-Silberberg, F. S., Bhattacharya, S., et Broach, J. R. (1995). Nutrient availability and the RAS/cyclic AMP pathway both induce expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by different mechanisms. *Mol Cell Biol* 15, 3187-3196.
- Neueglise, C., Bon, E., Lepingle, A., Wincker, P., Artiguenave, F., Gaillardin, C., et Casaregola, S. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 9. *Saccharomyces kluyveri*. *FEBS Lett* 487, 56-60.

- Nierras, C. R., Liebman, S. W., et Warner, J. R. (1997). Does *Saccharomyces* need an organized nucleolus? *Chromosoma* 105, 444-451.
- Nierras, C. R., et Warner, J. R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274, 13235-13241.
- Noll, M. (1978). [Structure of interphase chromosomes]. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 34, 321-335.
- Nomura, M. (2001). Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 555-565.
- Oakes, M., Siddiqi, I., Vu, L., Aris, J., et Nomura, M. (1999). Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Mol Cell Biol* 19, 8559-8569.
- Oakes, M. L., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K., et Nomura, M. (2006a). Expression of rRNA genes and nucleolus formation at ectopic chromosomal sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26, 6223-6238.
- Oakes, M. L., Siddiqi, I., French, S. L., Vu, L., Sato, M., Aris, J. P., Beyer, A. L., et Nomura, M. (2006b). Role of histone deacetylase Rpd3 in regulating rRNA gene transcription and nucleolar structure in yeast. *Mol Cell Biol* 26, 3889-3901.
- Osheim, Y. N., Mougey, E. B., Windle, J., Anderson, M., O'Reilly, M., Miller, O. L., Jr., Beyer, A., et Sollner-Webb, B. (1996). Metazoan rDNA enhancer acts by making more genes transcriptionally active. *J Cell Biol* 133, 943-954.
- O'Sullivan, A. C., Sullivan, G. J., et McStay, B. (2002). UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 22, 657-668.
- Perche, P. Y., Robert-Nicoud, M., Khochbin, S., et Vourc'h, C. (2003). [Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants]. *Med Sci (Paris)* 19, 1137-1145.
- Perry, R. P. (1981). RNA processing comes of age. *J Cell Biol* 91, 28s-38s.
- Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 410-414.
- Pikaard, C. S., Pape, L. K., Henderson, S. L., Ryan, K., Paalman, M. H., Lopata, M. A., Reeder, R. H., et Sollner-Webb, B. (1990). Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 10, 4816-4825.

- Pikaard, C. S., et Reeder, R. H. (1988). Sequence elements essential for function of the *Xenopus laevis* ribosomal DNA enhancers. *Mol Cell Biol* 8, 4282-4288.
- Planta, R. J., et Mager, W. H. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 471-477.
- Powers, T., et Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 987-1000.
- Prescott, E. M., Osheim, Y. N., Jones, H. S., Alen, C. M., Roan, J. G., Reeder, R. H., Beyer, A. L., et Proudfoot, N. J. (2004). Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6068-6073.
- Pusarla, R. H., et Bhargava, P. (2005). Histones in functional diversification. Core histone variants. *Febs J* 272, 5149-5168.
- Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., Rando, O. J., et Madhani, H. D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.
- Raska, I., Shaw, P. J., et Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18, 325-334.
- Reeder, R. H. (1984). Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 38, 349-351.
- Reeder, R. H. (1999). Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 293-327.
- Reeder, R. H., Guevara, P., et Roan, J. G. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 7369-7376.
- Reid, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O., et Struhl, K. (2000). Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol Cell* 6, 1297-1307.
- Rohde, J. R., et Cardenas, M. E. (2003). The tor pathway regulates gene expression by linking nutrient sensing to histone acetylation. *Mol Cell Biol* 23, 629-635.
- Rudra, D., Zhao, Y., et Warner, J. R. (2005). Central role of Ifh1p-Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *Embo J* 24, 533-542.
- Sandmeier, J. J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W. L., Gallo, C. M., Beyer, A. L., et Smith, J. S. (2002). RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J* 21, 4959-4968.

Santoro, R., et Grummt, I. (2005). Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol* 25, 2539-2546.

Schultz, M. C., Choe, S. Y., et Reeder, R. H. (1993). In vitro definition of the yeast RNA polymerase I enhancer. *Mol Cell Biol* 13, 2644-2654.

Schweizer, E., MacKechnie, C., et Halvorson, H. O. (1969). The redundancy of ribosomal and transfer RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 40, 261-277.

Siddiqi, I. N., Dodd, J. A., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M. L., Keener, J., Moore, R., Young, M. K., et Nomura, M. (2001). Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast *uaf30* mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *Embo J* 20, 4512-4521.

Smith, S. D., O'Mahony, D. J., Kinsella, B. T., et Rothblum, L. I. (1993). Transcription from the rat 45S ribosomal DNA promoter does not require the factor UBF. *Gene Expr* 3, 229-236.

Srivastava, A. K., et Schlessinger, D. (1991). Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* 73, 631-638.

Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., et Moss, T. (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* 21, 629-639.

Stefanovsky, V., et 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.

Stefanovsky, V. Y., Bazett-Jones, D. P., Pelletier, G., et Moss, T. (1996). The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Res* 24, 3208-3215.

Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D. P., Crane-Robinson, C., et Moss, T. (2001). DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* 29, 3241-3247.

Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Langst, G., et Grummt, I. (2001). NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J* 20, 4892-4900.

Tongaonkar, P., French, S. L., Oakes, M. L., Vu, L., Schneider, D. A., Beyer, A. L., et Nomura, M. (2005). Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10129-10134.

Tsang, C. K., Bertram, P. G., Ai, W., Drenan, R., et Zheng, X. F. (2003). Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *Embo J* 22, 6045-6056.

Tsang, C. K., et Zheng, X. F. (2007). TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle* 6, 25-29.

van der Sande, C. A., Kulkens, T., Kramer, A. B., de Wijs, I. J., van Heerikhuizen, H., Klootwijk, J., et Planta, R. J. (1989). Termination of transcription by yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 17, 9127-9146.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., et Kinzler, K. W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243-251.

Vogelauer, M., Cioci, F., et Camilloni, G. (1998). DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *J Mol Biol* 275, 197-209.

Vu, L., Siddiqi, I., Lee, B. S., Josaitis, C. A., et Nomura, M. (1999). RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA: role of transcription factor UAF (upstream activation factor) in silencing rDNA transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4390-4395.

Waldron, C., et Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol* 122, 855-865.

Warner, J. R. (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 53, 256-271.

Warner, J. R., Vilardell, J., et Sohn, J. H. (2001). Economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 567-574.

Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J., et Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.

Zhao, Y., McIntosh, K. B., Rudra, D., Schawalder, S., Shore, D., et Warner, J. R. (2006). Fine-structure analysis of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol* 26, 4853-4862.