



HAL
open science

Conséquence physiologiques et mécanistiques de l'interaction covalente du facteur Rm3 avec l'ARN polymérase I chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Nayla Ayoub

► **To cite this version:**

Nayla Ayoub. Conséquence physiologiques et mécanistiques de l'interaction covalente du facteur Rm3 avec l'ARN polymérase I chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT: . tel-00446803

HAL Id: tel-00446803

<https://theses.hal.science/tel-00446803>

Submitted on 13 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE : Biochimie et Biologie Moléculaire

DOCTORAT

Génomés et protéines

Nayla Ayoub

Conséquences physiologiques et mécanistiques de l'interaction covalente du facteur Rrn3 avec l'ARN polymérase I chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Physiological and mechanistic consequences of the covalent interaction between Rrn3 and RNA polymerase I in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Thèse dirigée par Christophe Carles et Michel Riva

Soutenue le 23 Septembre 2009

JURY

M. Patrick Vicart
Mme Cathy Jackson
M. Giorgio Dieci
Mme Danièle Hernandez-Verdun
M. Christophe Carles

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

En février 2005 j'arrivais tout droit de Beyrouth pour faire ma thèse au CEA. Aujourd'hui, après quatre ans et demi passés au sein du SBiGeM ou (SBGM.....) ça fait vraiment bizarre de se dire que c'est terminé. Tous ces moments passés parmi vous ont été très enrichissants aussi bien scientifiquement qu'humainement et je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté pendant ces années.

Tout d'abord je remercie les membres du jury, Mesdames Cathy Jackson et Danièle Hernandez-Verdun et Messieurs Patrick Vicart, Giorgio Dieci et Christophe Carles d'avoir accepté de lire et de juger ce travail.

Je remercie Michel Werner et Christophe Carles de m'avoir accueillie dans le service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (SBIGeM) du CEA de Saclay.

Merci à Michel et Christophe. Tout d'abord pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné la chance de venir réaliser ma thèse en France dans votre équipe. Merci à vous pour vos conseils et vos critiques, vous avez su me communiquer votre passion pour la biochimie et surtout la rigueur scientifique. Merci Michel pour ta franchise et ta disponibilité malgré ton éloignement au bâtiment 532. Merci Christophe pour tes éternels encouragements pendant les moments durs de la thèse.

Je tiens à remercier la Fondation pour la Recherche Médicale de m'avoir octroyé un financement pour la réalisation de ma quatrième année de thèse.

Merci aux membres actuels et anciens de l'équipe de Michel et Christophe :

Merci Cécile pour ton écoute et ta gentillesse et pour toutes les longues discussions qu'on a pu avoir.

Gwenaëlle merci pour tous tes conseils et surtout merci d'être toujours là .

Merci à Manu F. avec qui j'ai travaillé pendant mon DEA et qui m'a appris les rudiments du laboratoire.

Merci Nazif toi qui a partagé avec moi le couloir de la mort dans notre ancien labo, et qui m'a initiée à la Pol III.

Merci Stéphane pour toutes les discussions qu'on a pu avoir et surtout pour ta disponibilité malgré ton déménagement au bâtiment 142 et ton éloignement du monde de la transcription.

Merci à Caro, Stéphanie, Sabrina, Greg, Nathalie qui étaient là et sans qui l'ambiance au labo n'aurait jamais été aussi bonne.

Peggy, merci pour ta disponibilité et pour l'aide précieuse que tu as apportée à mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres du 1^{er} étage : Géraldine rayon de soleil venu tout droit du sud merci pour ta bonne humeur éternelle . Tous les membres de l'équipe Pol

III Olivier, Christine, Joel pour tous les conseils que vous m'avez donnés durant toutes ces années.

Merci Christian d'avoir pris soin de mon taux de magnésium afin qu'il soit toujours au top pendant toute la thèse.

Emilie merci pour tout...

Merci Erwan et Arounie pour votre gentillesse et pour les nombreux services que vous m'avez rendus....

Je remercie également tous les ex membres du service en particulier Fred, Marta, Camille, Cyril, Alex et Benoit sans qui la vie au SbiGeM n'aurait pas été aussi sympa.

Merci Béa l'éternelle optimiste avec qui j'ai partagé les moments agréables, stressants et enthousiasmants d'une thèse.....

Je remercie également Manu G. qui mettait l'ambiance dans les couloirs et qui s'occupait à merveille de toutes mes commandes de radioactivité.

Merci Chantal et Catherine pour les nombreux services que vous m'avez rendus pendant ma thèse.

Je remercie l'ensemble de mes amis avec une attention particulière pour Lina, Youmna, Yasmina et Roger vous avez toujours été là pour moi.

Merci à ma famille au Liban et en France pour votre soutien votre patience et votre compréhension. Je vous remercie d'avoir toujours été présents de loin ou de près.

Enfin merci à tous.

Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ADNr :	ADN ribosomal
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomal
ARNt :	ARN de transfert
CDB :	Cassure double brin
Cpm :	Coup par minute
DAPI :	Diaminophénylindol
DEPC :	DiEthyl PyroCarbonate
DO :	Densité optique
dNTP :	dATP + dCTP + dGTP + dTTP
dXTP :	Désoxy (A=adénosine, C=cytosine, G=guanosine, T=thymidine, U=uridine)- 5' tri-phosphate
GFP:	Green Fluorescent Protein
h :	Heure
HA :	Hémagglutinine du virus de l'influenza
IP :	Immunoprécipitation
min :	Minute
nt :	Nucléotide
ORF :	Open reading frame, phase ouverte de lecture
pb :	Paire de base
PCR :	Polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne
PIC :	Complexe de préinitiation
Pol :	ARN Polymérase
Rap :	Rapamycine
RFB :	Replication Fork Barrier
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
sec :	Seconde
sn ARN :	Small nuclear RNA, petit ARN nucléaire
sno ARN :	Small nucleolar RNA, petit ARN nucléolaire
TBP:	Tata Binding Protein
TCA :	Acide Tri-chloro acétique
UAF :	Upstream Activating Factor
UE :	Upstream Element
UV :	Ultra-Violet
WT :	Wild Type, sauvage
YPD :	Yeast extract (extrait de levure)- Bactopeptone - D-glucose

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	5
Table des matières	6
Introduction	9
I) La transcription par l'ARN Polymérase I	12
I-1) Organisation des copies d'ADNr	12
I-2) La transcription spécifique de l'ADNr 35S	14
II) Biogenèse des ribosomes et Nucléole	28
II-1) Biogenèse des ribosomes	28
II-2) Le nucléole	31
III) Régulation de la transcription Pol I	40
III-1) Conditions de la régulation de la transcription Pol I	41
III-2) Mécanismes de la régulation de la transcription Pol I	46
PREAMBULE : LA PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE	56
Résultats et discussion	62
I) Relation entre activité Pol I et structure du nucléole	62
I-1) Etude de la localisation de la Pol I dans des cellules WT et CARA lors d'un traitement à la rapamycine	62
I-2) Etude de l'activité Pol I dans les cellules Wt et CARA lors d'un traitement à la rapamycine	66
I-3) Etude de l'occupation de l'ADNr 35S par la Pol I dans les cellules CARA lors d'un traitement rapamycine	68
I-4) Pourquoi, en l'absence de rapamycine, l'occupation moyenne par la Pol I des copies d'ADNr dans les cellules CARA est-elle plus faible que dans les cellules Wt ?	76
II) Analyse mécanistique de la transcription Pol I	92
II-1) Généralités et problématique	92
II-2) Rappel sur le système de transcription spécifique Pol I in vitro	93
II-3) Stratégie utilisée pour l'étude de la vitesse d'élongation	96
II-4) Les complexes ternaires de classe I bloqués en élongation restent compétents pour la transcription	102
II-5) In vitro, la vitesse d'élongation de la Pol I Wt est plus rapide que celle de la Pol I CARA	105
III) Conséquences phénotypiques de l'association covalente du facteur Rrn3 avec la Pol I	126
Perspectives	130
I) Conséquences de la non dissociation du complexe Pol I-rrn3	130
I-1) Sur le cycle transcriptionnel de la Pol I (<i>in vitro</i>)	130
I-2) In vivo :	134
II) Structure du nucléole dans les cellules WT et CARA lors d'un traitement long à la rapamycine	136
Matériels et Méthodes	138
I) Matériel	138
I-1) Souches et Milieux	138
I-2) oligonucléotides :	139
II) Méthodes :	140
II-1) Étude de l'expression des gènes	140
II-2) Analyse du génome de la structure et de l'occupation de la chromatine	141
II-3) Études biochimiques	148
II-4) Études statistiques	150

<i>Bibliographie</i>	152
<i>Annexes:</i>	166
Etude de la fidélité de l'ARN polymérase la Pol III	166

Introduction

La première étape de l'expression des gènes est la transcription qui permet l'expression de l'information génétique contenue dans l'ADN en une copie d'ARN. L'enzyme centrale de la transcription est l'ARN polymérase ADN dépendante qui catalyse la polymérisation de ribonucléotides triphosphates de façon complémentaire à la matrice d'ADN. L'existence de cette activité enzymatique est établie en 1957 dans un extrait de foie de rat (Weiss and Gladstone, 1959). Cette nouvelle activité est alors recherchée et détectée dans divers organismes vivants (Huang et al., 1960; Hurwitz et al., 1960). En 1969, Burgess publie la purification et l'analyse moléculaire de l'ARN polymérase ADN dépendante d'*Escherichia coli*. La même année, Roeder et Rutter mettent en évidence la présence de trois formes d'ARN polymérase ADN-dépendantes dans des cellules eucaryotes (Roeder and Rutter, 1969). Cette observation est depuis lors devenue générale puisque trois formes d'ARN polymérase nucléaires (Pol I, Pol II et Pol III) ont été mises en évidence chez tous les eucaryotes étudiés à ce jour. Ces enzymes se différencient par leur composition sous-unitaire, leur localisation cellulaire, leur sensibilité à une toxine l' α -amanitine ainsi que par les classes de gènes qu'elles transcrivent et les facteurs de transcription qui leur sont associés.

L'ARN polymérase I (Pol I), constituée de 14 sous-unités, est responsable de la synthèse d'environ 60% des ARN cellulaires. Elle est localisée dans le nucléole et est dédiée à la transcription d'un gène unique l'ADNr 35S qui code le précurseur des ARNr 25S, 18S et 5,8S.

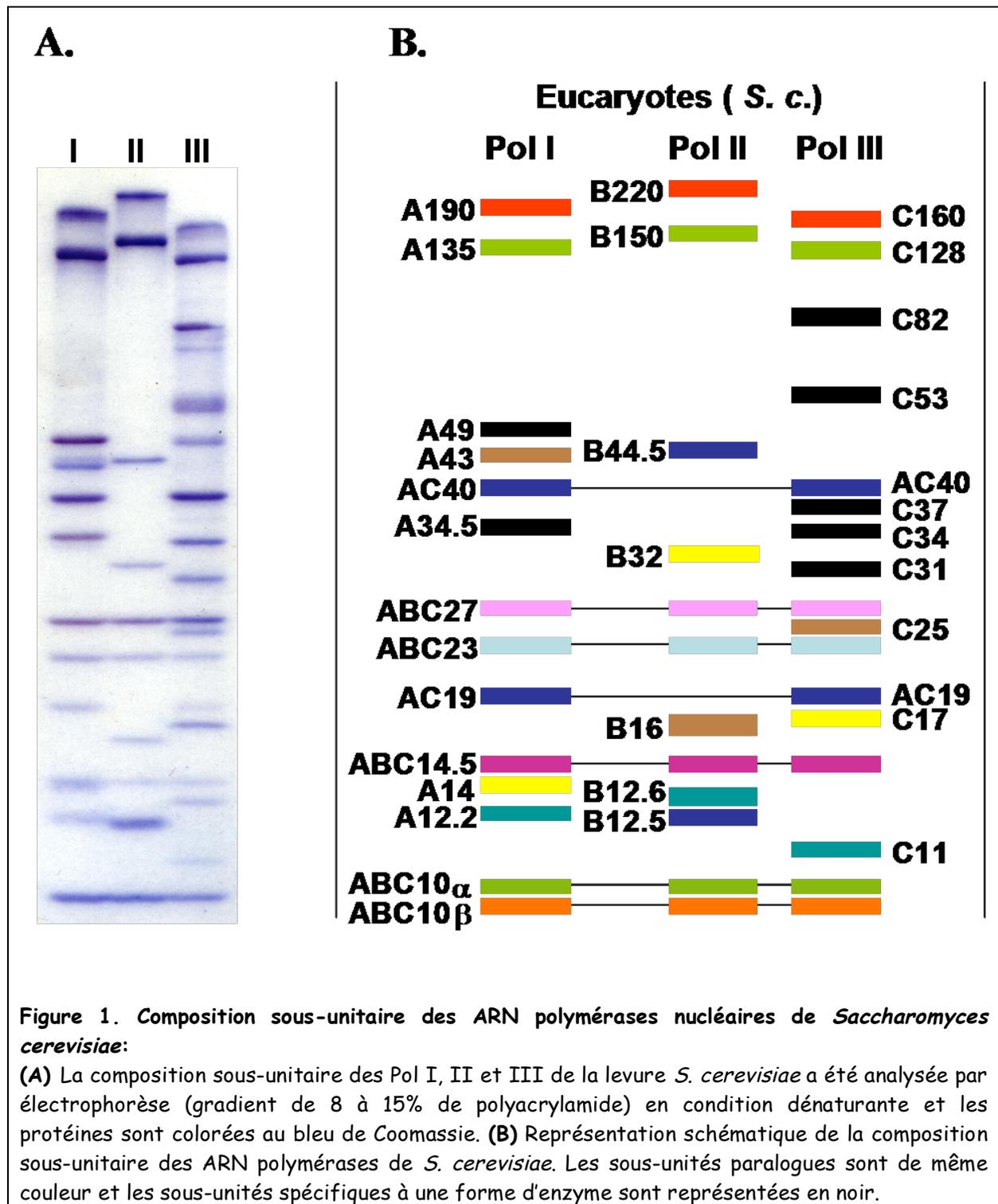
L'ARN polymérase II (Pol II) constituée de 12 sous-unités transcrit la plus grande partie du génome. Elle est localisée dans le nucléoplasme et est responsable de la synthèse de tous les ARN messagers et de nombreux petits ARN non traduits (SnARN).

L'ARN polymérase III (Pol III) constituée de 17 sous-unités, est également localisée dans le nucléoplasme, la Pol III synthétise l'ARNr 5S, les ARN de transfert (ARNt) et d'autres petits ARN non traduits. (Figure 1)

Beaucoup plus récemment, deux formes supplémentaires d'ARN polymérase ADN-dépendantes nucléaires (Pol IV et Pol V) ont été mises en évidence chez les plantes.

Elles sont responsables de la synthèse de siARN et du silencing respectivement (Wierzbicki et al., 2008)

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de la relation entre l'activité Pol I et la structure du nucléole ainsi que sur le rôle du facteur de transcription Rrn3 dans la transcription des gènes de classe I. Dans cette introduction, j'aborderai plus particulièrement les mécanismes de la transcription par l'ARN polymérase I et je rappellerai l'état des connaissances sur un domaine nucléaire particulier qui est le site de la biogenèse des ribosomes : le nucléole.



I) La transcription par l'ARN Polymérase I

I-1) Organisation des copies d'ADNr

Chez les eucaryotes, la Pol I est dédiée à la transcription d'un gène unique (ADNr 35S chez la levure *S. cerevisiae* et ADNr 47S chez les vertébrés). Ce gène est présent en très grand nombre de copies par génome et selon l'espèce considérée, les génomes nucléaires peuvent contenir des dizaines, des centaines voire des milliers de copies d'ADNr comme chez les plantes (Long and Dawid, 1980; Rogers et al., 1993). Ces copies sont présentes sous deux formes : les copies accessibles à la machinerie transcriptionnelle de classe I (dites actives) et qui représentent 50% des copies présentes dans le génome, et les copies non accessibles (dites inactives) (Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1993).

Chez la levure *S. cerevisiae*, toutes les copies d'ADNr, dont le nombre varie entre 150 et 200 copies par génome haploïde sont regroupées au sein du locus *RDN1* localisé sur le bras droit du chromosome XII. Dans une souche mutante où le locus *RDN1* est supprimé et remplacé par un plasmide multicopies porteur d'une seule copie d'ADNr, les cellules ne présentent pas de défaut de croissance (Nogi et al., 1991b; Oakes et al., 1998), démontrant ainsi que la localisation chromosomique et la structure en tandem du locus *RDN1* ne sont essentielles ni pour la transcription par l'ARN Pol I, ni pour l'assemblage des ribosomes. Chez la levure *S. cerevisiae*, l'unité d'ADNr a une taille de 9,1KB et code un transcrit de 6,7Kb et une séquence intergénique de 2,4Kb

Une unité d'ADNr est constituée de deux régions transcrites (*RDN37* et *RDN5*) et de deux régions non transcrites *NTS1* et *NTS2* (Non Transcribed Sequence). La transcription des gènes *RDN37* (par la Pol I) et *RDN5* (par la Pol III) se fait de manière divergente. (figure 2)

Une unité d'ADNr contient en plus des séquences des ARNr 25S, 18S et 5,8S deux séquences externes 5'ETS et 3'ETS (External Transcribed Spacer), localisées aux extrémités et deux séquences internes ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Sequence) qui séparent les séquences 18S-5,8S et 25S. Les séquences ETS sont éliminées lors du processus de maturation de l'ARNr 35S (Allmang and Tollervey, 1998).

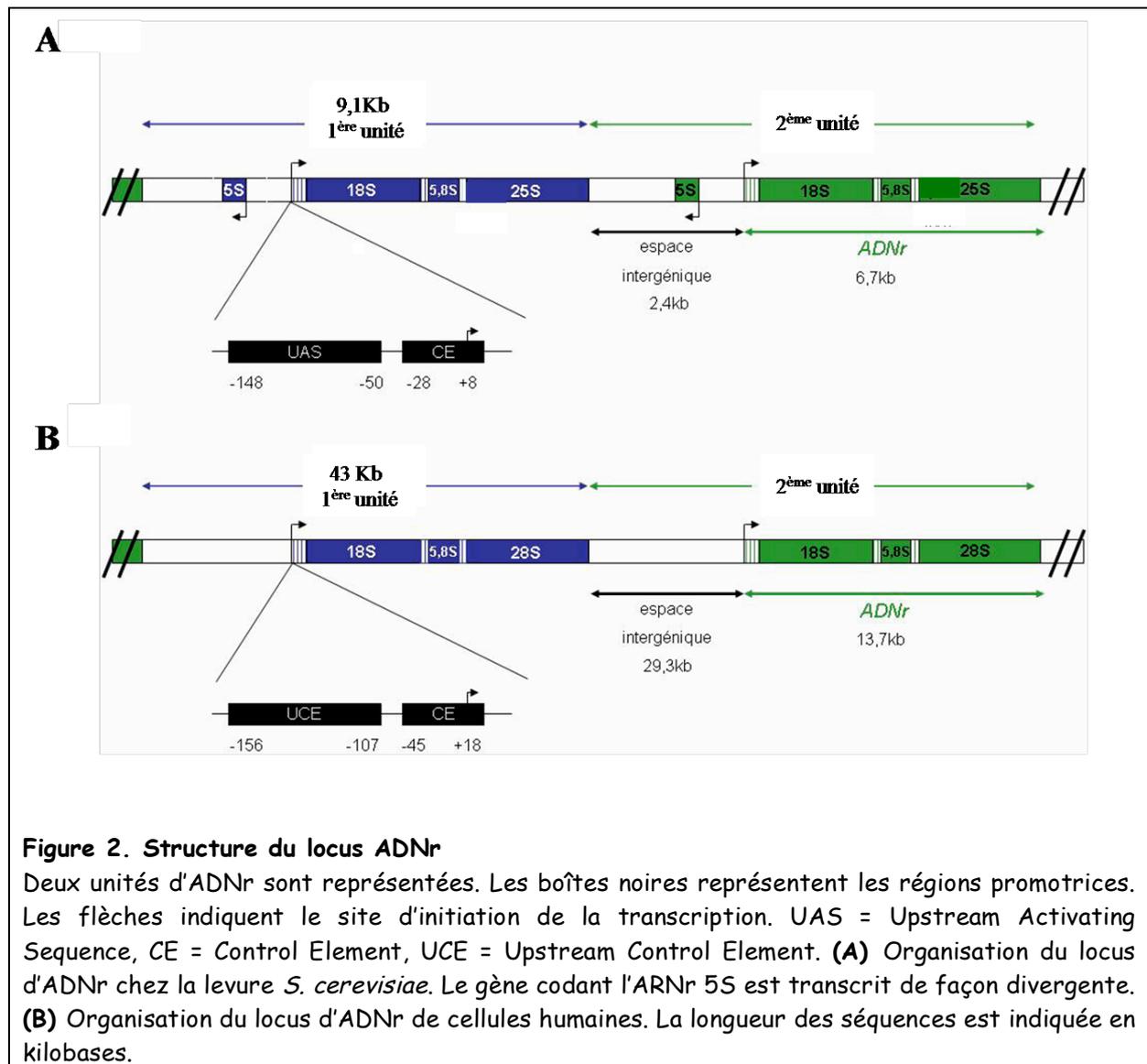


Figure 2. Structure du locus ADNr

Deux unités d'ADNr sont représentées. Les boîtes noires représentent les régions promotrices. Les flèches indiquent le site d'initiation de la transcription. UAS = Upstream Activating Sequence, CE = Control Element, UCE = Upstream Control Element. **(A)** Organisation du locus d'ADNr chez la levure *S. cerevisiae*. Le gène codant l'ARNr 5S est transcrit de façon divergente. **(B)** Organisation du locus d'ADNr de cellules humaines. La longueur des séquences est indiquée en kilobases.

L'intégralité du promoteur se situe au niveau de l'espace intergénique NTS2. Des expériences de délétions au niveau de cette région ont montré que la séquence qui s'étend du nucléotide -146 au nucléotide +8 est suffisante pour la transcription et c'est cette région qui est définie comme le promoteur de l'ADNr de *S. cerevisiae* (Musters et al., 1989). Ce promoteur est bipartite, il comprend : l'élément aval strictement essentiel à l'initiation de la transcription qui s'étend du nucléotide -28 au nucléotide +8, il est appelé promoteur basal ou « core element » (CE), l'élément amont (appelé séquence activatrice amont ou « Upstream Activating Sequence », (UAS) qui s'étend du nucléotide -146 au nucléotide -50. Il exerce un effet stimulateur mais n'est a priori pas strictement requis pour l'initiation de la transcription. L'espace entre les deux éléments du promoteur ainsi que leur orientation sont des paramètres importants qui déterminent

la force du promoteur (Musters et al., 1989; Xie and Rothblum, 1992). La région NTS1 située en aval du 35S comporte le site de terminaison de la transcription de l'ADN 35S. Deux courtes séquences semblent être indispensables à la terminaison de la transcription (Lang et al., 1994; Lang and Reeder, 1993; Lang and Reeder, 1995) il s'agit du site de fixation du facteur de terminaison Reb1 appelé terminateur T1 et d'une séquence riche en T qui code les douze derniers nucléotides du transcrit. Cette séquence serait nécessaire pour la dissociation des complexes ternaires. En plus de ces séquences, il existe des régions activatrices distales (« enhancer like ») qui augmenteraient la stabilisation des complexes de préinitiation assemblés aux promoteurs de l'ADNr. (Wai et al., 2001)

Chez les eucaryotes supérieurs, les unités d'ADNr sont généralement regroupées au sein de régions chromosomiques appelées régions organisatrices du nucléole ou NOR (Nucleolar Organizer Region) dans lesquelles elles s'enchaînent le plus souvent en orientation directe. Les cellules diploïdes humaines contiennent 400 copies d'ADNr organisées en plusieurs NOR et localisées sur les 5 paires de chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22).

Chez les mammifères, l'ADNr a une taille de 43Kb, une séquence codante de 13,7Kb et une séquence intergénique de 29,2Kb. (figure 2)

La structure bipartite du promoteur de l'ADNr est également retrouvée chez les mammifères (Closs and Kempe, 1986; Haltiner et al., 1986; Jones et al., 1988; Learned et al., 1983). Chez l'homme, l'élément amont (appelé « Upstream Control Sequence ») s'étend du nucléotide -156 au nucléotide -107 et l'élément aval s'étend du nucléotide -45 au nucléotide +18.

I-2) La transcription spécifique de l'ADNr 35S

I-2-1) Initiation

Bien qu'elle soit dédiée à la transcription d'un gène unique l'ADN 35S/47S, la Pol I seule est incapable de reconnaître le promoteur de l'ADNr. Des facteurs généraux de

transcription (dits de classe I) vont former un complexe de préinitiation qui permettra le recrutement de l'enzyme sur le promoteur.

Formation du complexe de préinitiation :

Un crible génétique réalisé par l'équipe du Pr. Nomura (Université de Californie, Irvine, USA) a permis d'identifier les deux facteurs généraux de transcription requis pour la formation du complexe de préinitiation qui va permettre le recrutement de la Pol I sur le promoteur de l'ADNr (Nogi et al., 1991a). Il s'agit du « Core factor » (CF) et de « l'Upstream Activating Factor » (UAF, associé à TBP). Le CF reconnaît le promoteur basal, et UAF reconnaît la séquence activatrice. L'ensemble formé par l'association de ces deux facteurs de transcription avec le promoteur constitue le complexe de préinitiation. (figure 3)

Ce crible repose sur l'idée démontrée par l'équipe du Pr. Nomura que la seule fonction essentielle de l'ARN polymérase I est la synthèse de l'ARNr 35S. Des cellules transformées avec le plasmide réplcatif portant une unité d'ADNr placée sous le contrôle du promoteur inductible du gène *GAL7* sont mutagenisées à l'éthyl méthane sulfonate. Les mutants thermosensibles qui poussent en présence de galactose et qui sont incapables de pousser en présence de glucose à température restrictive (36°C) ne sont affectés que pour un gène essentiel à la transcription des gènes de classe I.

Ces gènes appelés *rrn* (« rRNA synthesis defective ») ont été classés en plusieurs groupes de complémentation, dont certains codent des sous-unités de l'ARN polymérase I (Rpa135, Rpa43, Rpa12) et d'autres des sous-unités des facteurs d'initiation de la transcription Pol I -

Le Core Factor est un complexe protéique constitué de 3 sous unités Rrn6, Rrn7 et Rrn11 chacune essentielle à la viabilité cellulaire (Keys et al., 1994; Lalo et al., 1996; Lin et al., 1996). Ce complexe se fixe sur le promoteur basal de l'ADNr 35S, mais cette liaison n'est pas très forte et elle est stabilisée par la liaison préalable du facteur UAF à la séquence activatrice.

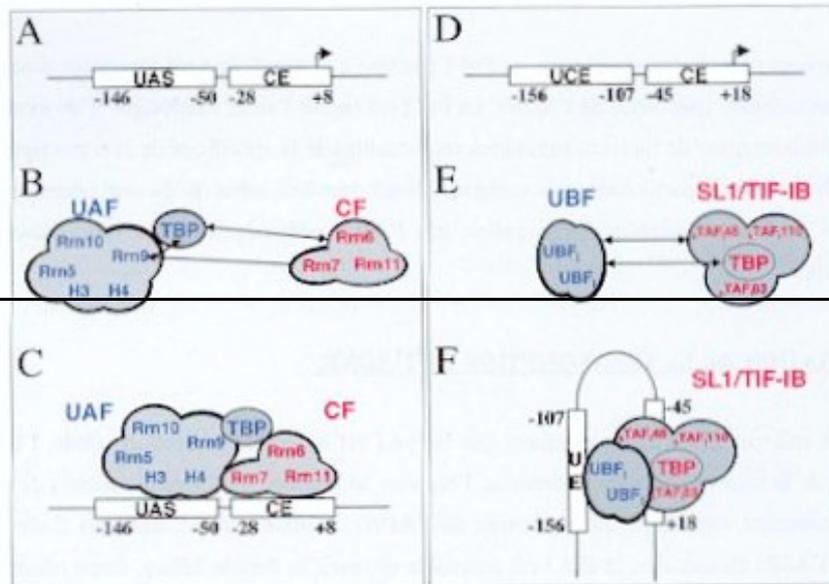


Figure 3. Complexe de préinitiation chez la levure *S. cerevisiae* et chez l'homme:

Panneau de gauche : exemple de *S. cerevisiae*. (A) Organisation du promoteur de l'ADNr 35S. La flèche indique le site d'initiation de la transcription. Les chiffres indiquent la position des deux éléments promoteurs par rapport au site d'initiation de la transcription. UAS : Upstream Activating Sequence. CE : Core Element. (B) Facteurs impliqués dans la reconnaissance du promoteur de l'ADNr 35S. UAF : Upstream Activating Factor. TBP : TATA Binding Protein. CF : Core Factor. H3, H4 : Histones H3 et H4. Les flèches indiquent les interactions physiques qui ont été mises en évidence. (C) Modèle d'assemblage du complexe de préinitiation (PIC) sur le promoteur de l'ADNr 35S (d'après Nomura, 1998).

(D), (E) et (F) exemple chez *Homo sapiens*. (D) Organisation du promoteur de l'ADNr 47S. UCE : Upstream Control Element. CE : Core Element. (E) Facteurs impliqués dans la reconnaissance du promoteur de l'ADNr 47S. Le facteur UBF (Upstream Binding Factor) est un homodimère de UBF1. TBP : TATA Binding Protein. SL1/TIF-IB : Selectivity Factor for Pol I/ Transcription Initiation Factor IB. Les flèches indiquent les interactions physiques qui ont été mises en évidence. (F) Modèle d'assemblage du complexe de préinitiation sur le promoteur de l'ADNr 47S. En contactant simultanément l'élément amont et la partie proximale de l'élément basal, UBF induit une courbure de l'ADN au niveau du promoteur de l'ADNr 47S.

Le facteur UAF est constitué des histones H3 et H4 et de quatre sous-unités Rrn5, Rrn9 Rrn10 et uaf30. Les gènes codants les sous-unités Rrn5, Rrn9 et Rrn10 ne sont pas strictement essentiels à la viabilité cellulaire, cependant, leur délétion confère un très fort retard de croissance aux cellules (Keys et al., 1996) et une forte réduction de la synthèse de l'ARNr 35S est observée dans ces souches. *In vitro*, l'initiation de la transcription est fortement réduite dans des extraits cellulaires dépourvus de Rrn5, Rrn9 ou Rrn10, et restaurée par l'addition du complexe UAF. L'un des rôles du facteur UAF est de stimuler la transcription de l'ADNr 35S par le recrutement du CF sur le

promoteur grâce à la protéine TBP (TATA Binding Protein) qui pourrait ponter les deux facteurs. En effet TBP interagit d'une part avec la sous-unité Rrn9 de UAF et d'autre part avec la sous-unité Rrn6 du CF. (Lalo et al., 1996; Lin et al., 1996; Steffan et al., 1996). Une étude récente a montré que la sous-unité uaf30 est un facteur essentiel pour le ciblage de UAF sur le promoteur de l'ADNr permettant ainsi l'activation de plusieurs copies d'ADNr 35S (Hontz et al., 2008)

En plus de son rôle dans la stimulation de la transcription de l'ADNr 35S il a été montré que le complexe UAF empêchait la transcription de l'ADNr par la Pol II. Cette fonction a été mise en évidence par l'étude de mutants dans lesquels le gène de l'une des sous-unités de UAF a été inactivé. (Oakes et al., 1999). Certains de ces mutants étaient capables de survivre en l'absence d'activité Pol I et présentaient une croissance proche de celle des cellules sauvages. Dans ces souches, il a été montré que l'ADNr 35S est transcrit par la Pol II. Ce phénomène appelé « polymerase switch » est associé à la déstructuration du nucléole ainsi qu'à l'amplification du nombre de copies d'ADNr au locus *RDN1*. De plus, il a été récemment démontré que le complexe UAF jouait un rôle dans la modulation du nombre de gènes ADNr actifs en réponse aux nutriments (Hontz et al., 2008)

Chez les mammifères, l'étude biochimique du PIC a permis l'identification de deux facteurs : UBF (Upstream Binding Factor) et TIF-IB (chez la souris)/ SL1 (chez l'homme).(figure 3) Le complexe TIF-IB/SL1, homologue fonctionnel du Core factor (malgré l'absence d'homologie entre les différentes sous-unités de ces deux complexes) est strictement requis pour la transcription basale de l'ADNr 47S. C'est un complexe protéique de 300 kDa contenant TBP et au moins trois TAFI (TBP Associated Factors) TAFI 95/110, TAFI 68/63 et TAF I 48. (Schnapp and Grummt, 1991). Récemment deux nouveaux TAFI ont été identifiés TAFI 41 et TAFI 12 (Denissov et al., 2007; Gorski et al., 2007). Le facteur UBF agit en tant que dimère en se fixant à la fois sur la séquence activatrice et sur le promoteur basal. Cette fixation induit la formation d'une boucle de 140 pb de l'ADNr, générant ainsi une structure appelée « enhancesome » (Stefanovsky et al., 2001a) qui conduit à la juxtaposition du promoteur basal et de la séquence activatrice. De plus le facteur UBF se localise tout le long de l'ADNr et confère ainsi

une structure particulière à la chromatine. (O'Sullivan et al., 2002). En plus de son rôle pour le recrutement du facteur SL1 sur le promoteur et de la Pol I (Jantzen et al., 1992; McStay et al., 1991), de nouveaux rôles lui ont été attribués comme la régulation de l'étape d'échappement du promoteur (Panov et al., 2006) et de l'élongation (Stefanovsky et al., 2006).

Recrutement de la Pol I sur le PIC :

Le gène *RRN3* a été identifié et caractérisé grâce au crible génétique des mutants *RRN* décrit précédemment (Yamamoto et al., 1996). Le facteur *Rrn3* est une protéine de 72 kDa essentielle à la viabilité cellulaire qui est strictement requise pour la transcription de l'ADNr. Le facteur *Rrn3* s'associe à la Pol I (Milkereit and Tschochner, 1998) et le complexe Pol I-*Rrn3* ainsi formé est la seule forme d'enzyme compétente pour l'initiation de la transcription. *In vitro*, il a été montré que la Pol I peut être recrutée sur le PIC en l'absence de *Rrn3* (Cavanaugh et al., 2008) mais elle reste incompétente pour l'initiation de la transcription même après l'addition du facteur *Rrn3*. Le complexe Pol I-*Rrn3* ne peut être isolé qu'à partir de cellules en phase exponentielle de croissance et il ne représente que 2% du pool de Pol I présent dans la cellule (Milkereit and Tschochner, 1998). Il a été démontré dans notre laboratoire que *Rrn3* s'associe à la Pol I via son interaction avec la sous-unité A43. Par des expériences de double hybride, il a également été montré que le facteur *Rrn3* interagit avec la sous unité *Rrn6* du CF. (Peyroche et al., 2000). Ainsi, le facteur *Rrn3* interagissant d'une part avec la sous-unité A43 de la Pol I et d'autre part avec la sous-unité *Rrn6* du CF permet le recrutement du complexe PolI-*Rrn3* sur le PIC.

Chez les mammifères, la Pol I est également recrutée sur le promoteur grâce au facteur TIF-IA, l'homologue structural et fonctionnel de *Rrn3*. (Bodem et al., 2000). Le facteur TIF-IA interagit avec la sous-unité de la Pol I murine homologue à la sous-unité A43 de levure (Cavanaugh et al., 2002; Yuan et al., 2002) et le complexe PolI-TIF-IA est ensuite recruté sur le promoteur de l'ADNr grâce aux interactions avec les sous unités TAFI 63 et TAFI 110 du complexe SL1/TIF-IB. (Miller et al., 2001). Il a récemment été démontré que la phosphorylation du facteur TIF-IA par la protéine CK2 au niveau des

sérines 170 et 172 conduit à la dissociation du complexe PolI/TIF-IA après l'initiation de la transcription. La déphosphorylation de ces mêmes résidus par FCP1 facilite la réassociation de TIF-IA avec la Pol I permettant ainsi un nouveau cycle de transcription (Bierhoff et al., 2008)

Le clonage et la caractérisation des facteurs de préinitiation de la levure et des mammifères ont montré peu d'homologie de séquence, excepté pour le facteur TIF-IA qui est l'homologue très conservé de Rrn3. Cependant, malgré cette absence d'homologie, le recrutement du complexe Pol I-Rrn3 (ou Pol I-TIF-IA) est un mécanisme très conservé.

Nous verrons d'ailleurs dans la partie III-2 que la formation / dissociation du complexe Pol I-Rrn3 est l'une des cibles majeures de la régulation de l'activité de transcription des gènes de classe I.

Le recrutement du complexe PolI-Rrn3 sur le PIC conduit à la formation d'un complexe d'initiation dit « fermé » car la double hélice d'ADN n'est pas encore ouverte. La transcription démarre ensuite par l'ouverture de la double hélice d'ADN (complexe d'initiation ouvert). L'ARN polymérase est dès lors capable de catalyser la formation des premières liaisons phosphodiester, sans qu'il y ait translocation du complexe le long de l'ADN. Lorsque la taille de l'ARN néosynthétisé atteint une dizaine de nucléotides, la Pol I change de conformation, rompt les interactions précédemment établies avec le PIC et quitte le promoteur. Cette étape appelée échappement du promoteur est la dernière étape de l'initiation de la transcription et constitue l'étape limitante de la transcription (Panov et al., 2001).

I-2-2) Elongation

Si l'étape d'initiation de la transcription est très bien caractérisée, les mécanismes contrôlant l'élongation par l'ARN Polymérase I sont encore mal connus. La forte corrélation entre l'élongation par la Pol I et la maturation de l'ARNr 35S (Schneider et al., 2007) évoque l'interdépendance entre l'élongation par la Pol II et les étapes de la mise de la coiffe en 5' et de l'épissage. Des études récentes suggèrent l'implication de facteurs d'élongation Pol II dans l'élongation par la Pol I comme le complexe Paf1 les

facteurs Spt4, Spt5, TFIIH et CSB/Rad26 (Bradsher et al., 2002; Iben et al., 2002; Lebedev et al., 2008; Schneider et al., 2006; Zhang et al., 2009)

Le complexe Paf1:

Ce complexe comprend 5 sous-unités principales : Cdc73p, Ctr9p, Leo1p, Paf1p et Rtf1p. (Krogan et al., 2002) C'est un complexe multifonctionnel qui intervient à plusieurs niveaux au cours de la transcription par l'ARN polymérase II: au niveau de l'initiation, de l'élongation, de la maturation des ARNm et il affecte également la structure chromatinienne (Krogan et al., 2003; Stolinski et al., 1997) Le mécanisme par lequel ce complexe affecte l'élongation de la transcription par la Pol II n'a pas encore été déterminé.

Il a récemment été démontré que le complexe Paf1 était requis pour assurer l'élongation efficace par l'ARN Pol I (Zhang et al., 2009). Les auteurs ont démontré que ce complexe s'associe à l'ADNr *in vivo*, et que dans des souches inactivées pour des sous-unités de ce complexe, l'activité de la Pol I était réduite. Des expériences de Miller spread dans une souche *ctr9Δ* suggèrent que le complexe Paf1 module la vitesse d'élongation de la Pol I en agissant sur les sites de pause transitoires.

Le complexe Spt4/Spt5 :

Spt4/Spt5 est un facteur d'élongation qui interagit directement avec la Pol II, et cette interaction est importante pour l'élongation (Hartzog et al., 1998). Des études récentes ont montré que l'inactivation du gène non essentiel SPT4 conduisait à la diminution de l'efficacité de l'élongation par la Pol II dans des régions riches en nucléotides GC et à la diminution de la processivité de l'enzyme (Mason and Struhl, 2005; Rondon et al., 2003). L'équipe de David Schneider (Université de l'Alabama, Birmingham, USA) a suggéré que le complexe Spt4/Spt5 pourrait être impliqué dans l'élongation par la Pol I en jouant un rôle au niveau du couplage entre la transcription et la maturation de l'ADNr 35S.

TFIIH

TFIIH est un facteur multiprotéique de grande taille (510KDa), impliqué dans la transcription et dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair ou NER), qui prend en charge la réparation des lésions dues aux ultraviolets. Les deux sous-unités de TFIIH, XPD et XPB possèdent des activités ADN hélicases inverses. Des mutations touchant ces activités hélicases sont à l'origine chez l'homme du Xeroderma pigmentosum, maladie qui se traduit par une grande sensibilité aux UV et par une forte prédisposition aux cancers cutanés et qui est due à la déficience du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

Il a été proposé que le facteur TFIIH était impliqué dans la transcription par l'ARN polymérase I (Iben et al., 2002). Cette proposition se base sur le fait que TFIIH est capable de stimuler *in vitro* la transcription par la Pol I et que sa localisation est en partie nucléolaire dans les cellules humaines. Chez la levure, les auteurs suggèrent également l'implication de TFIIH dans la transcription par la Pol I en se basant sur le fait que des mutants de TFIIH présentent des défauts de transcription par la Pol I .

CSB :

La protéine CSB est une ATPase ADN dépendante, qui est importante dans la transcription couplée à la réparation (Bradsher et al., 2002).

La mutation de cette protéine est à l'origine du syndrome de Cockayne qui est caractérisé par une hypersensibilité aux UV, un fort retard mental et une atrophie rétinienne (Lehmann, 2003). Ces symptômes pleiotropes ne s'expliqueraient que si CSB était un facteur général de la transcription par la Pol II. En effet, des données *in vitro* montrent que des extraits préparés à partir de cellules de patients atteints par cette maladie présentent des défauts transcriptionnels par la Pol II et ceci en l'absence de dommages à l'ADN. (Balajee et al., 1997).

Il a été montré que la protéine CSB se localisait dans le nucléole, et qu'elle était recrutée au niveau des copies actives d'ADNr via le facteur TTFI. (Yuan et al., 2007).

Une étude récente a démontré que la protéine CSB recombinante réactivait la transcription Pol I dans des extraits de cellules de patients atteint du syndrome de

Cockayne et que la protéine CSB activait l'élongation dans un test de transcription in vitro (Lebedev et al., 2008)

En plus de tous ces facteurs d'élongation Pol II, le facteur UBF et la sous unité 19S du protéasome jouent également un rôle dans l'élongation par la Pol I (Fatyol and Grummt, 2008; Stefanovsky and Moss, 2008)

Il a été récemment démontré par l'équipe de Tom Moss (Université de Laval, Québec, Canada) que la protéine UBF, localisée tout le long de l'ADNr, est capable d'arrêter la progression de la Pol I en élongation, sous sa forme non phosphorylée. La phosphorylation de ce facteur, par ERK en réponse à des facteurs de croissance, empêche la formation de la structure dite enhancesome et permet alors une meilleure élongation par la Pol I.

La sous-unité non catalytique du protéasome, la sous unité 19S joue un rôle dans la transcription Pol II au niveau de l'élongation (Ferdous et al., 2001). Des données récentes suggèrent que ce facteur pourrait également être impliqué dans la transcription par la machinerie de classe I (Fatyol and Grummt, 2008). En effet, la synthèse du précurseur des grands ARN ribosomiques est inhibée par les inhibiteurs du protéasome et les ATPases 19S se localisent au niveau du promoteur et tout le long de la région codante de l'ADNr.

Assemblage cotranscriptionnel de la machinerie de maturation (Figure 4)

C'est en 1969 que l'équipe de O.L Jr Miller observe directement l'organisation moléculaire des gènes ribosomaux activement transcrits à partir d'oocytes de xénope, par la technique du Miller spread. Les images obtenues des locus ADNr évoquent une structure dite en arbre de Noël. Cette structure correspond à l'ADNr sur lequel irradiant les pré-ARNr naissants selon un gradient de taille correspondant à l'avancée de la Pol I en élongation. Aux bouts de ces ARN naissants, ils avaient observé des « boules » dont la nature et la structure biochimique sont longtemps restées inconnues.

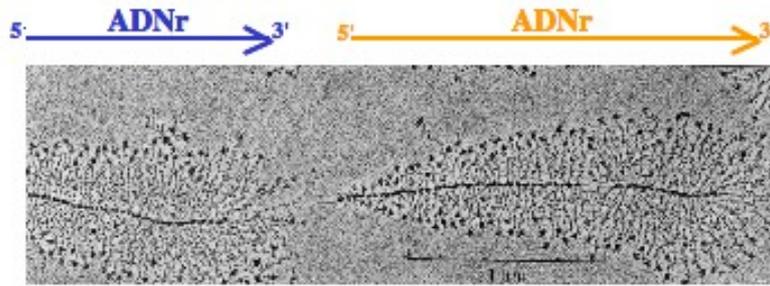


Figure 4. Structure en "arbre de Noël" de l'ADN ribosomique. Observation au microscope électronique de l'ADN ribosomique préparé par la méthode de Miller. Deux unités d'ADNr successives, séparées par un espace intergénique, sont observées. Chaque gène d'ADNr est transcrit par un grand nombre d'ARN polymérases ($n > 100$ sur le gène de droite). Les boules situées à l'extrémité 5' des ARN naissants correspondent à des complexes de maturation de l'ARNr qui s'associent à l'ARN en cours de synthèse. D'après Foe et al., 1978.

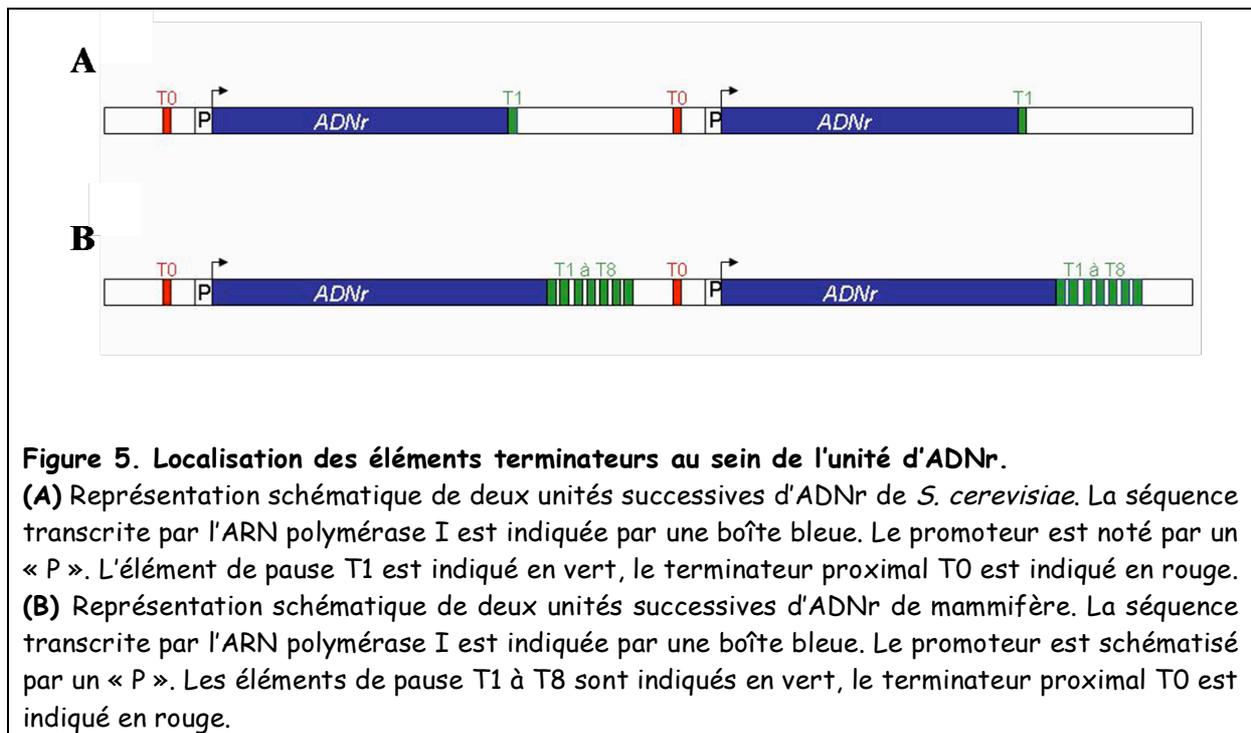
Des études chez le xénope ont montré que des séquences d'ARNr nécessaires pour la maturation sont également requises pour la formation de ces petites boules. Donc il a été proposé que ces boules terminales représentent les complexes de maturation qui assemblent le préARNr en cours de transcription. (Mougey et al., 1993)

Chez la levure *S. cerevisiae* l'observation des unités d'ADNr est facilitée du fait du locus unique d'ADNr. Il a été observé chez la levure que la déplétion de certaines des protéines du processome bloque la formation de ces complexes (Dragon et al., 2002; Osheim et al., 2004). Ces données suggèrent donc un assemblage cotranscriptionnel de la machinerie de maturation. D'ailleurs il a été démontré par Miller spread qu'un clivage au niveau de ITS1 a lieu cotranscriptionnellement au niveau de 55% des transcrits chez la levure de plus les complexes terminaux deviennent de plus en plus gros cotranscriptionnellement avant le clivage au site ITS1 suggérant que l'assemblage, la maturation/modification de l'ARNr, et l'addition des protéines ribosomales a aussi lieu de façon cotranscriptionnelle.

De plus, une étude récente renforce la notion d'interdépendance entre élongation et maturation de l'ARNr 35S : une mutation au niveau de la sous unité A135 de la Pol I provoquant un défaut d'élongation conduit également à des défauts de maturation du pré-ARNr et d'assemblage des ribosomes. (Schneider et al., 2007).

I-2-3) Terminaison

La terminaison de la transcription consiste en l'arrêt de la transcription et le relargage de l'ARN néosynthétisé. Cette étape nécessite la présence de plusieurs facteurs et a lieu au niveau de séquences spécifiques de l'ADNr.



Chez la levure, le terminateur est une séquence notée T1 située 93 nucléotides après la région transcrite par la Pol I (Lang et al., 1994; Lang and Reeder, 1993; Langst et al., 1997; Prescott et al., 2004). 10% des molécules Pol I continuent de transcrire au delà de cette séquence mais celles-ci s'arrêtent plus loin au niveau d'une séquence TO située à 250 nucléotides après la région transcrite par la Pol I (Reeder et al., 1999). (Voir figure 5) Chez les mammifères, l'organisation est similaire, le terminateur est composé d'une séquence répétée 8 fois située 21 nucléotides en aval de la séquence transcrite (Grummt et al., 1985). En amont de ces sites, une séquence riche en thymine facilite la dissociation du complexe ternaire et le relargage du transcrit (Reeder and Lang, 1997).

Chez la souris, le facteur TTF-I reconnaît une séquence cible sur l'ADNr et bloque physiquement l'élongation par la Pol I, le relargage du transcrit nécessite en plus l'action du facteur PTRF (Jansa et al., 2001).

L'arrêt de l'élongation du transcrit chez *S. cerevisiae* requiert la présence de la protéine Reb1 homologue du facteur TTFI de souris, des expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent également l'existence d'un facteur équivalent à PTRF, mais celui-ci n'a pas encore été identifié (Reeder and Lang, 1997; Tschochner and Milkereit, 1997).

Reb 1 est une protéine capable de promouvoir la transcription par la Pol I *in vitro* (Lang et al., 1994) et des mutations du gène REB1 provoquent des défauts de terminaison. En plus d'interrompre la transcription par la Pol I, la protéine Reb1 semble activer la transcription des copies adjacentes. En effet, la protéine Reb 1 ne se fixe pas seulement au niveau de la séquence T1 mais également sur une séquence d'environ 250 pb située en amont du promoteur appelée terminateur proximal T0 (Vogelauer et al., 1998). Il a été proposé qu'elle pourrait connecter le site de terminaison au promoteur de l'unité d'ADNr suivante augmentant ainsi la vitesse de réinitiation de la transcription par la Pol I. Selon ce modèle, chaque unité d'ADNr formerait une boucle de manière à rassembler les copies du gène codant l'ARN 35S d'une part et les régions intergéniques d'autre part (Figure 6) Cette conformation permettrait aux molécules de Pol I terminant la transcription d'une unité d'ADNr d'être recrutées directement sur le promoteur de l'unité suivante. Selon ces données, le facteur Reb1 jouerait un rôle dans l'organisation de la structure des unités d'ADNr afin de faciliter la transcription.

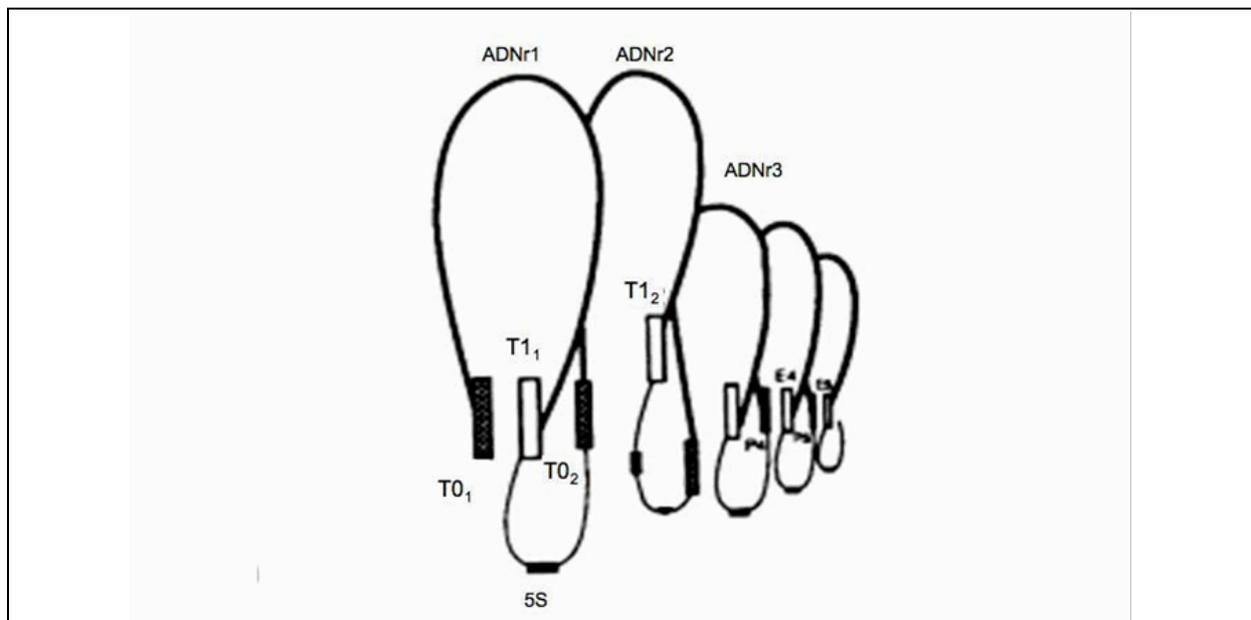


Figure 6. Implication de la protéine Reb1 dans la ré-initiation de la transcription.

La protéine Reb1 est capable de se fixer sur la séquence de terminaison T1 ainsi que sur le terminateur proximal T0. L'oligomérisation des molécules Reb1 situées au niveau des terminateurs T1 et T0 permettrait le rapprochement du site de terminaison avec le promoteur de l'ADNr, ce qui faciliterait la ré-initiation de la transcription par l'ARN polymérase I. D'après (Kulkens et al. 1992).

La sous-unité A12.2 de l'ARN polymérase I est également impliquée dans la terminaison de la transcription : l'inactivation du gène non essentiel codant cette sous-unité affecte l'efficacité de la terminaison (Prescott et al., 2004) Cette sous-unité est l'homologue de la sous-unité Rpb9 de l'ARN polymérase II qui est également impliquée dans la terminaison de la transcription par la Pol II (Awrey et al., 1997).

Nouveau modèle proposé pour la terminaison de la transcription par la Pol I chez la levure:

Récemment, les équipes de David Tollervey (Université d'Edinburgh, Royaume-Uni) et de Nick Proudfoot (Université d'Oxford, Royaume-Uni) ont proposé que les polymérases I et II de levure employaient des mécanismes similaires pour la terminaison de la transcription. (El Hage et al., 2008; Kawauchi et al., 2008)

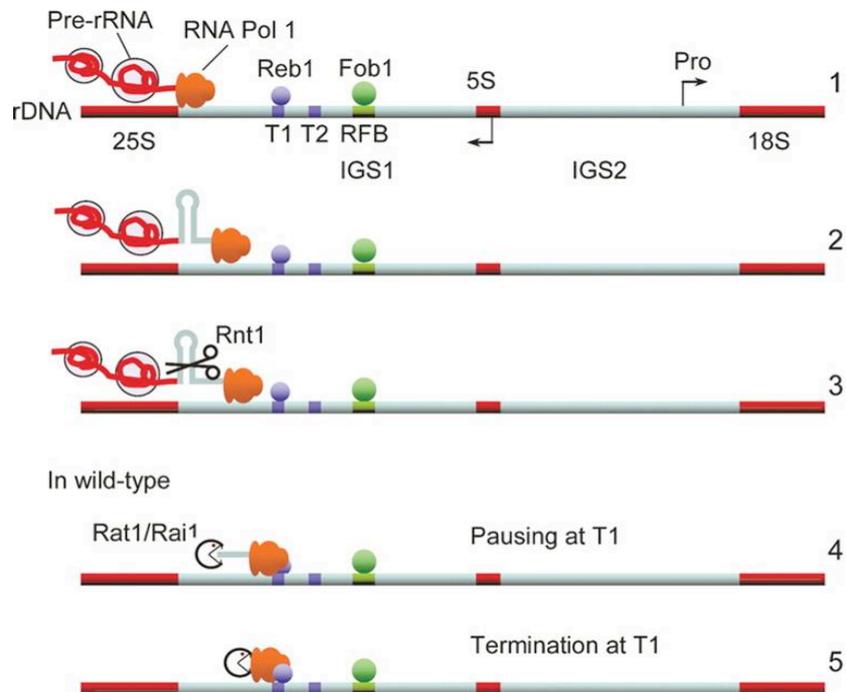


Figure 7. Modèle de la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase I

La machinerie de maturation s'associe à l'ARNr en cours de transcription, et la Pol I transcrit au-delà du site de clivage par Rnt1. Le pré-ARNr est ensuite clivé au niveau d'une structure en boucle par l'enzyme Rnt1. Ce clivage crée le point d'entrée pour le complexe Rat1/Rai1 qui dégrade le transcrit associé à la Pol I et induit par un processus encore indéterminé la dissociation du complexe de transcription. D'après El hage et al (2008)

Pendant la transcription, l'endonuclease Rnt1 clive le transcrit naissant aux positions +14/15 et +49/50 au niveau d'une structure en boucle, en 3' de la séquence du 25S. Cette enzyme interagit avec la sous unité A12,2 de la Pol I (Catala et al., 2008) et l'inactivation du gène codant cette protéine conduit à la modification de la structure chromatinienne. Dans une souche RNT1 Δ , la terminaison de la transcription est affectée et une grande proportion de Pol I continuent à transcrire au delà de T1, jusqu'à T0. (Catala et al., 2008; Prescott et al., 2004). Toutes ces données montrent que le clivage cotranscriptionnel de l'ARNr 35S naissant est important pour la terminaison efficace au niveau de T1.

Le clivage de l'ARNr naissant par Rnt1 génère des bouts d'ARN possédant une terminaison 5' monophosphate qui restent associés à la Pol I. Ceux-ci constituent le substrat idéal de l'exonucléase 5'-3' Rat1 qui va donc cliver ces transcrits et induire la dissociation de la Pol I probablement en déstabilisant le complexe ARN/ADN de 9 nucléotides et/ou en agissant sur les interactions ADN/protéines qui stabilisent les complexes Pol I. Il a été proposé que la protéine Rat 1 pourrait correspondre à l'analogue du facteur PTRF de la souris. (Figure 7)

II) Biogenèse des ribosomes et Nucléole

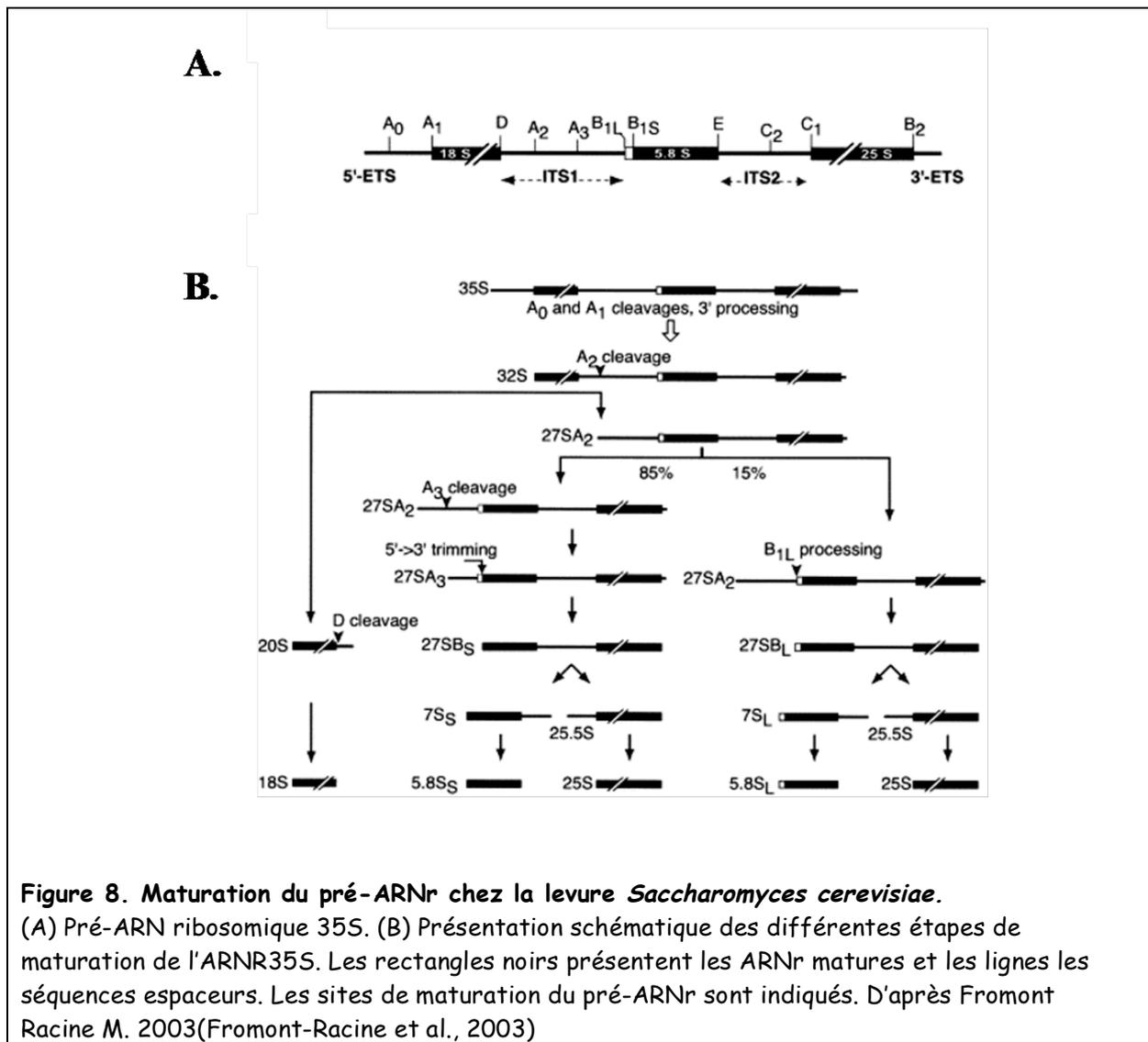
II-1) Biogenèse des ribosomes

Les ribosomes sont des particules ribonucléoprotéiques de très grande taille (4,2MDa chez les eucaryotes, 2,5MDa chez les bactéries) dont la structure atomique a été établie chez les bactéries et les archées (Ban et al., 2000; Yusupov et al., 2001).

Le ribosome est constitué de deux sous-unités de tailles différentes : la sous-unité 40S est constituée de l'ARNr 18S et de 32 protéines ribosomales (chez la levure) et est responsable de l'activité de décodage de l'information génétique. La grande sous-unité (60S) comprend les ARNr 5S, 5,8S et 25S/28S et 46 protéines ribosomales (chez la levure). Elle possède l'activité peptidyl transférase et catalyse donc la formation des ponts peptidiques.(Lafontaine and Tollervey, 2001).

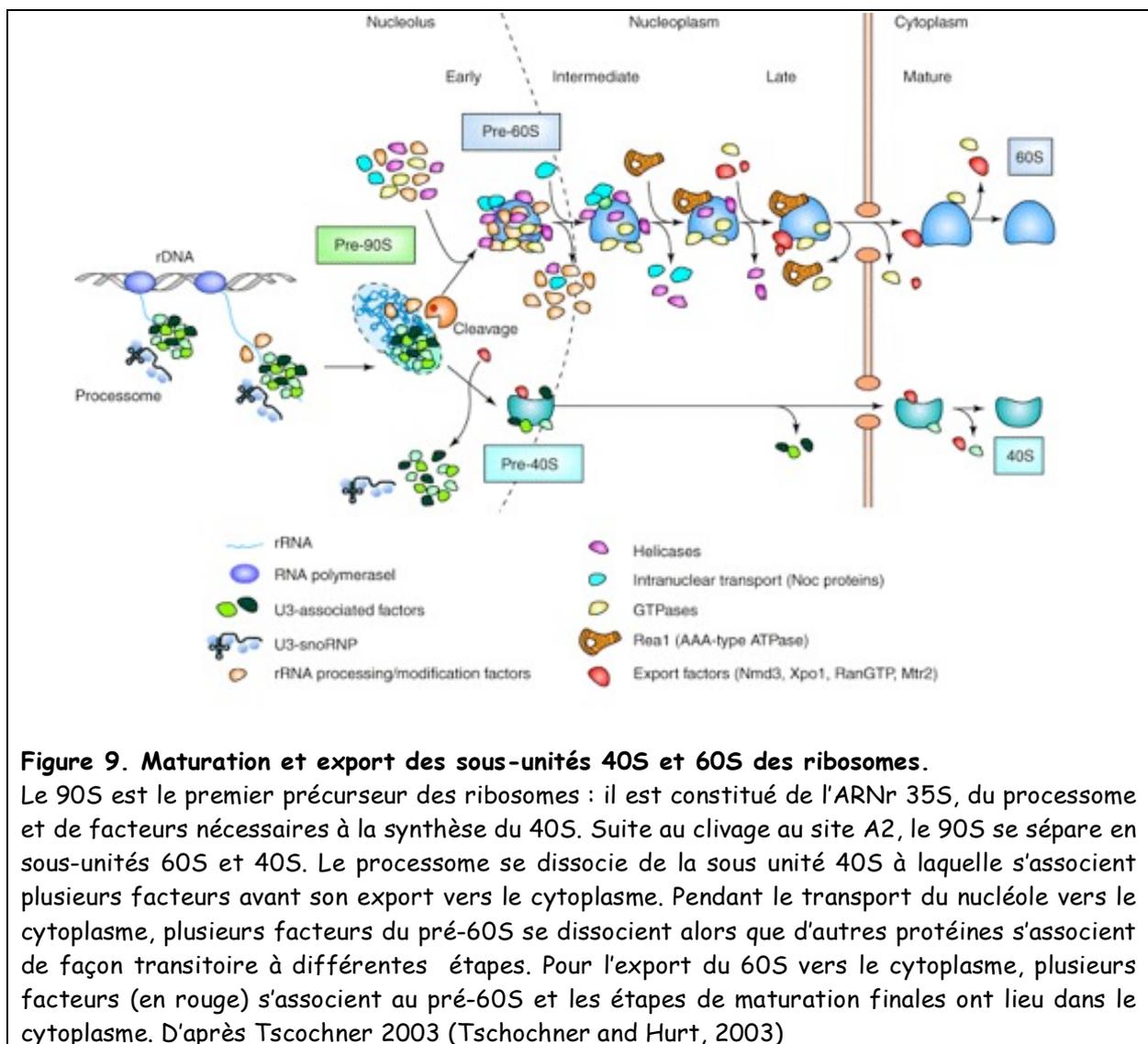
La synthèse des composants des ribosomes met en jeu les trois systèmes transcriptionnels de la cellule . Nous avons vu que les ARNr sont synthétisés par la Pol I (ARNr 35S) et par la Pol III (ARNr 5S).

L'ARNr 35S subit toute une série de clivages par des endo et exonucléases ainsi que des modifications ciblées qui font intervenir un grand nombre de snoARN (small nucleolar) et conduisent à la formation des ARNr matures 5,8S; 18S et 25S. La grande majorité de ces modifications sont des conversions d'uridine en pseudouridines et des méthylations de l'oxygène en position 2' des riboses. (figure 8)



La Pol II synthétise les pré-ARNm des protéines ribosomales ainsi que des facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Les protéines ribosomales sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans le noyau où elles s'associent aux pré-ARNr et forment alors une particule ribonucléoprotéique de très grande taille : le pré-ribosome 90S. Ce pré-complexe va être ensuite converti en précurseurs des sous-unités de 40S (contenant l'ARNr 18S) et 60S (les ARNr 25, 5,8 et 5S). Les dernières étapes de maturation du pré-complexe de 40S auront lieu dans le cytoplasme alors que le pré-complexe de 60S est majoritairement mûré dans le noyau avant d'être exporté dans le cytoplasme. Les deux sous-unités matures ainsi produites pourront s'associer sur l'ARNm pour former les ribosomes. (figure 9) N'étant pas au centre du travail mené au cours de cette thèse, je n'entrerai pas dans les détails mécanistiques de la maturation

et de l'assemblage des ARNr dont la figure 9 illustre la complexité. La biogenèse des ribosomes constitue l'un des processus les plus coûteux en énergie pour la cellule. Avec un temps de génération d'environ 100 min, une cellule de levure en condition exponentielle de croissance doit produire 2000 ribosomes par minute. Ainsi, la transcription par les Pol I, Pol II et Pol III des gènes spécifiant les composants du ribosome représente au moins 80% de la transcription nucléaire totale dans des cellules de levure en phase exponentielle de croissance. Ces trois machineries transcriptionnelles doivent donc être finement coordonnées afin d'assurer une production efficace des ribosomes.



II-2) Le nucléole

Le nucléole est un compartiment nucléaire qui a été observé il y a plus de deux siècles par F. Fontana. Depuis, il fait l'objet de nombreuses études et grâce aux avancées technologiques notre vision du nucléole est en perpétuelle évolution. En 1934, McClintock propose que le nucléole s'organise au moment de la télophase grâce à l'activité du « nucleolar organizer body ». Cette structure correspondant à une région spécifique au niveau du chromosome 6 chez le maïs, il a été proposé pour la première fois que le nucléole était lié à l'activité des gènes. En 1950, la présence de molécules d'ARN est démontrée dans le nucléole et en 1960 des expériences d'hybridation *in situ* révèlent la présence des gènes ribosomiques (ADNr) au niveau des NOR (nucleolar Organizer Region, régions chromosomiques au niveau desquelles les unités d'ADNr sont regroupées). A la même période, l'analyse biochimique des composants nucléolaires rendue possible grâce à l'isolation des noyaux permet de proposer que le nucléole est le siège de la biogenèse des ribosomes (pour revue Sirri et al., 2008).

II-2-1) Structure du nucléole

Le nucléole est une structure nucléaire proéminente visible en microscopie conventionnelle par contraste de phase ce qui lui a valu le nom d'organite bien qu'il ne soit entouré d'aucune membrane. C'est un domaine très dynamique dont l'apparence varie en fonction de son activité (Melese and Xue, 1995). Alors que les cellules de mammifères contiennent généralement plusieurs nucléoles, une cellule de levure contient un nucléole unique formant un croissant accolé à la membrane nucléaire.

Dans les cellules de mammifères, le nucléole est organisé en fonction du cycle cellulaire : déstructuré en prophase (lorsque la transcription Pol I est réprimée) et réassemblé à la fin de la mitose (lors de la reprise de la transcription Pol I). Chez la levure, le nucléole est présent tout le long du cycle cellulaire. (D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Torres-Rosell et al., 2004)

L'observation au microscope électronique du nucléole de mammifères met en évidence trois domaines structuraux majeurs : on distingue plusieurs centres fibrillaires (CF) entourés de composant fibrillaire dense (CFD). Ces structures sont enchâssées dans le composant granulaire (CG). Cette organisation tripartite n'est pas retrouvée chez tous

les organismes : chez la levure, la drosophile et les insectes, le nucléole est dépourvu de centre fibrillaire (Knibiehler et al., 1984; Knibiehler et al., 1982). Thiry et Lafontaine ont d'ailleurs suggéré que l'acquisition de la compartimentation tripartite nucléolaire avec un centre fibrillaire est apparue chez les amniotes donc à une étape tardive de l'évolution animale. (Thiry and Lafontaine, 2005). Chez les amniotes, l'ADNr contient un très grand espace intergénique entre deux unités de transcription et ces deux auteurs suggèrent que ces grands espaces intergéniques organisent le centre fibrillaire en un lieu de stockage de la Pol I.

La synthèse des transcrits primaires a lieu à l'interface entre le CF et le CFD puis les transcrits s'accumulent au niveau du CFD (Cmarko et al., 2000) où les pré-ARNr subissent une première maturation qui continue durant la migration intranucléolaire de l'ARN vers le CG dans lequel les particules préribosomiques s'assemblent. (Figure 11) Les protéines impliquées dans les premières étapes de maturation (telles que la fibrillarine (Nop1 chez la levure), la nucléoline et les snoARN U3 (Biggiogera et al., 1989; Ginisty et al., 1998; Ochs et al., 1985; Puvion-Dutilleul et al., 1991) se localisent au niveau du CFD. Alors que les protéines telle que la nucléophosmine, le PM-Scl 100 (rrp6 chez la levure) impliquées dans les étapes intermédiaires ou tardives de la maturation, se localisent au niveau du CG.

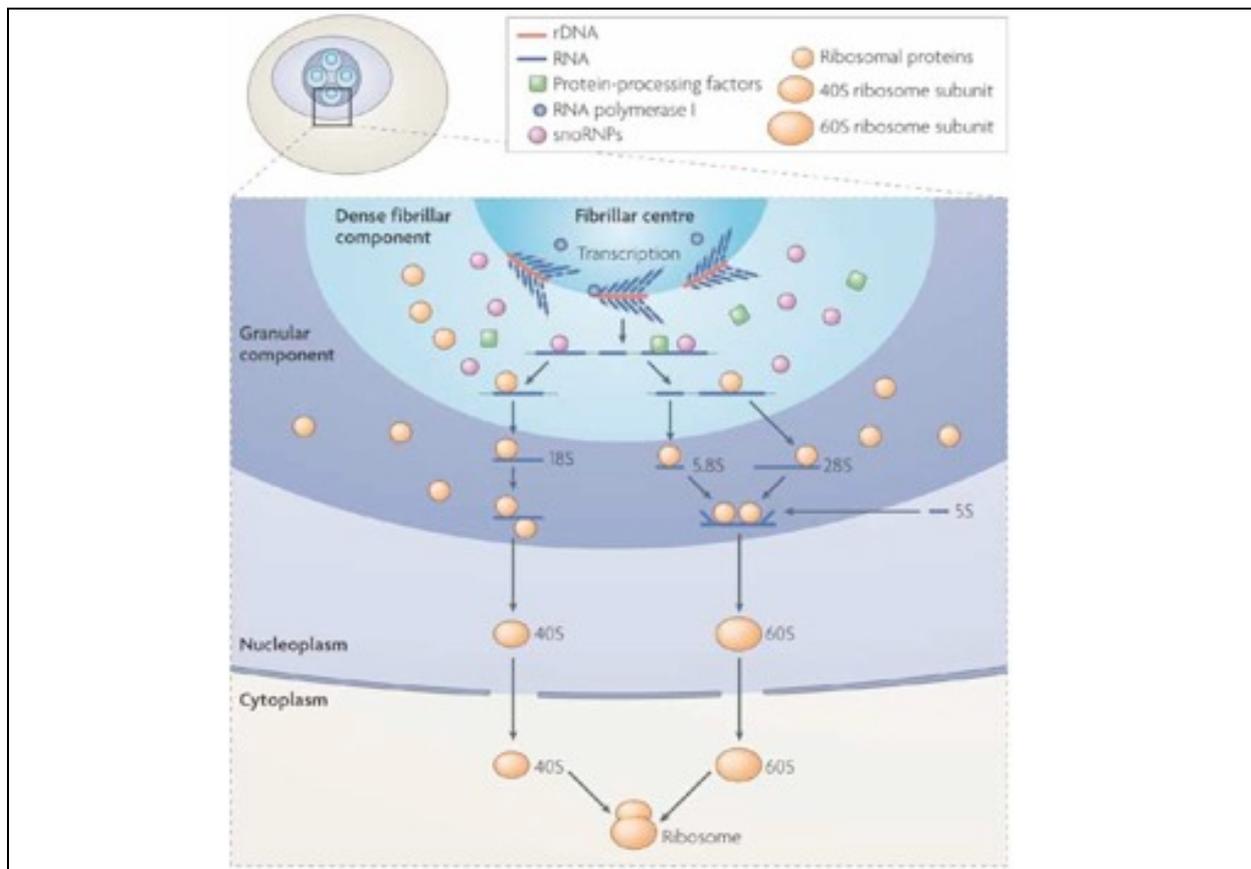


Figure 11. Modèle de la biogenèse des ribosomes dans le nucléole.

La transcription de l'ADNr par la Pol I a lieu à la frontière entre le centre fibrillaire et le composant fibrillaire dense. Les pré-ARNr sont clivés et modifiés par les snoRNP (small nucleolar ribonucleoproteins) au niveau du composant fibrillaire dense. L'assemblage et la maturation des particules préribosomiques se déroulent au niveau du composant granulaire. Dans cette structure, les ARN 5,8S, 28S et 5S d'une part et l'ARNr 18S d'autre part s'assemblent avec les protéines ribosomales pour former les sous-unités des ribosomes 60S et 40S respectivement. Les sous-unités 40S et 60S sont ensuite exportées dans le cytoplasme où elles se lient aux ARNm pour former des ribosomes fonctionnels. D'après Boisvert et al 2007 (Boisvert et al., 2007)

II-2-2) Cycle cellulaire et nucléole:

Chez les eucaryotes supérieurs, la mitose correspond à une période d'inactivation et/ou de délocalisation des machineries nucléaires et l'organisation fonctionnelle du noyau doit être reconstituée après chaque mitose. Le nucléole assemblé en fin de mitose est actif pendant l'interphase et désassemblé en début de mitose.

Pendant la prophase, une augmentation rapide du niveau du complexe cdk1/cycline B conduit à la phosphorylation de certains composants de la machinerie de classe I : SL1

et TTFI. Cet événement pourrait être à l'origine de la délocalisation des machineries nucléaires pendant la mitose qui débute par la délocalisation de la sous-unité RPA39 de la Pol I du centre fibrillaire juste avant la rupture de l'enveloppe nucléaire.(Leung et al., 2004) La machinerie de transcription Pol I demeure associée avec l'ADNr au sein des NOR actifs (Roussel et al., 1996): il a cependant été montré que certaines sous-unités de la Pol I RPA39, RPA16, RPA20 et RPA194 se dissocient transitoirement des NOR pendant la métaphase et se réassocient à l'anaphase alors que d'autres facteurs de transcription restent associés aux NOR actifs tout le long de la mitose (Dundr et al., 2000). Contrairement à la machinerie de transcription, la machinerie de maturation de l'ARNr ne reste pas associée aux NOR pendant la mitose.

Alors que plusieurs facteurs impliqués dans la maturation de l'ARNr se délocalisent du nucléole vers le cytoplasme, d'autres facteurs se lient aux chromosomes au niveau de la région périchromosomique. (Gautier et al., 1992)

Au niveau de ces régions, les composants de la machinerie de maturation se distribuent de façon homogène.

Le rôle exact de ces régions périchromosomiques est inconnu, mais plusieurs fonctions leur ont été proposées telles que la protection des chromosomes pendant la mitose en formant une barrière entre les chromosomes et le cytoplasme, ces régions pourraient également aider à assurer la distribution égale des composants de la machinerie de maturation entre les deux cellules filles.

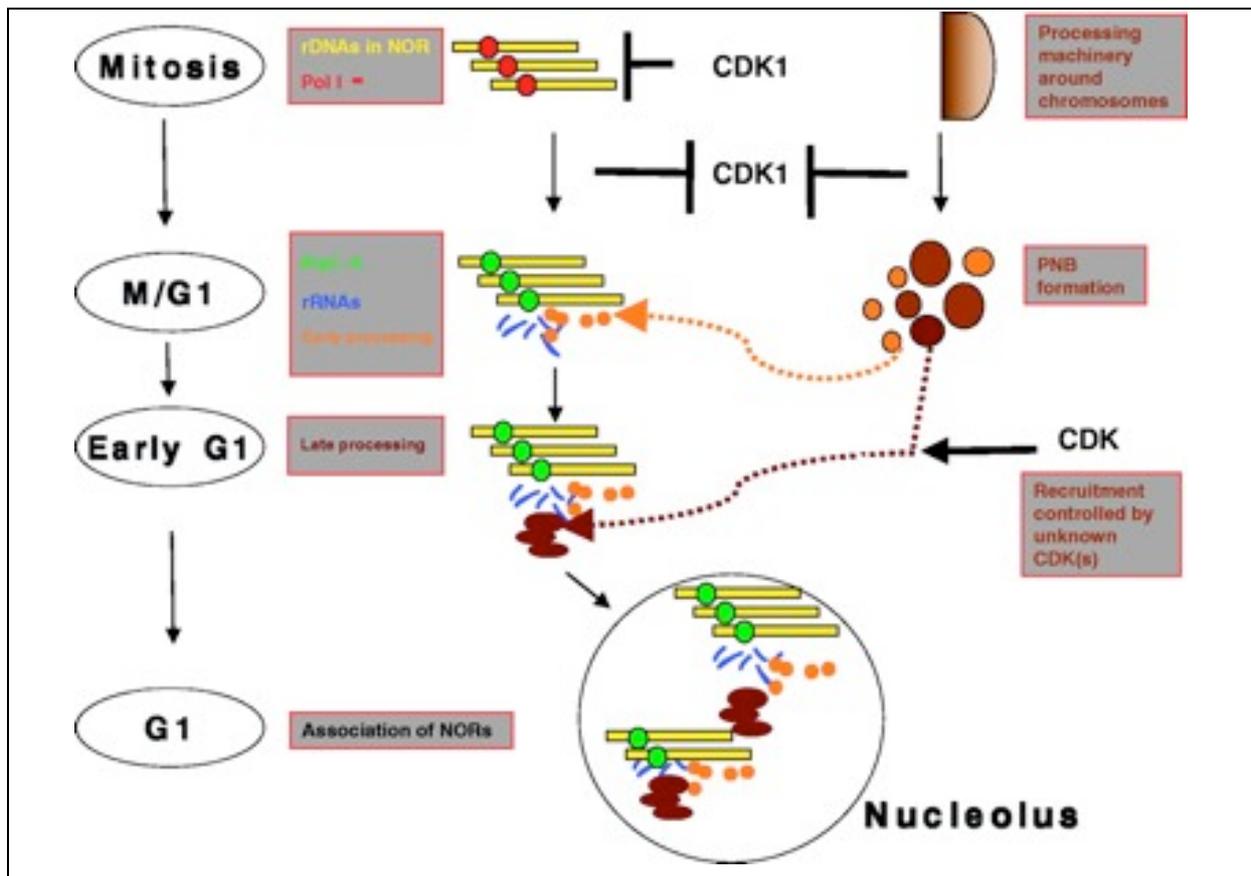


Figure 12. Assemblage du nucléole au cours du cycle cellulaire.

Durant la mitose, la machinerie de transcription de classe I est associée à l'ADNr au niveau des NOR (barres jaunes) et la machinerie de maturation (gradient marron) se distribue majoritairement autour des chromosomes. L'activité Pol I est réprimée (points rouges) pendant la mitose par l'activité du complexe cycline B-CDK1. À la fin de la mitose (M/G1), l'inhibition de l'activité du complexe cycline B-CDK1 lève la répression de l'activité Pol I (points verts) et induit la formation des PNB qui correspondent à plusieurs complexes de maturation (ronds oranges et marrons). Le recrutement de la machinerie de maturation responsable des premières étapes de maturation est concomitant avec l'activation de la transcription (l'ARNr est représenté par les traits bleus), mais la machinerie de transcription des phases tardives est recrutée plus tard (au début de la phase G1). Finalement l'association de plusieurs NORs en G1 conduit à la formation des nucléoles fonctionnels. D'après Hernandez Verdun D. 2002 . (Hernandez-Verdun et al., 2002)

Lors de l'anaphase, les composants de la machinerie de maturation restent associés au niveau des chromosomes ou se localisent dans le cytoplasme au niveau de structures appelées PNB (Pre-Nuclear bodies) dans les cellules en phase exponentielle de croissance.

En fin d'anaphase et début de télophase, le niveau du complexe cdk1/cycline B décroît ce qui conduit à la réactivation de la transcription de l'ADNr. (Sirri et al., 2000).

Durant la phase *G1*, les composants de la machinerie de maturation sont libérés dans le nucléole selon un ordre bien défini. Les machineries de maturation précoce sont recrutées en premier au niveau des nucléoles et on observe une expansion progressive du composant fibrillaire dense, puis les machineries de maturation tardives sont libérées des PNB et se lient au niveau des nucléoles nouvellement assemblés pour former le composant granulaire. (Sirri et al., 2002)

Finalement, après l'assemblage des machineries de transcription et de maturation au niveau de l'ADNr, les NORs se déplacent dans le nucléoplasme et leur fusion conduit à la formation des nucléoles fonctionnels observés pendant l'interphase. (figure 12)

II-2-3) Fonctions du nucléole :

Les données de la protéomique nucléolaire mettent en évidence une complexité inconnue jusqu'ici et indiquent que le nucléole est au centre d'échanges entre différents domaines nucléaires. (Andersen et al., 2002) Les analyses des données protéomiques nucléolaires de l'homme et des plantes (Andersen et al., 2002; Pendle et al., 2005) ont identifié environ 700 protéines chez l'homme et 500 protéines chez les plantes (McKeown P and Shaw P données non publiées). La classification de ces protéines en fonction de leur rôle biologique montre que seulement 30% ont une fonction reliée à la biogenèse des ribosomes. Le nucléole a donc été récemment impliqué dans d'autres fonctions cellulaires que la synthèse des ribosomes (pour revue Boisvert et al., 2007; Pederson, 1998) telles que : le contrôle de la croissance et du cycle cellulaire, le vieillissement, la détection de stress, la maturation et/ ou l'assemblage d'ARN non ribosomiques et /ou de ribonucléoprotéines et la séquestration de macromolécules ou de complexes non ribosomiques. Je détaillerai quelques unes de ces fonctions.

a) Régulation du cycle cellulaire :

La structure et la fonction du nucléole sont dynamiques tout le long de la phase *G1*. Il a d'ailleurs été démontré que plusieurs protéines s'associent avec le nucléole à des stades

spécifiques du cycle cellulaire, suggérant un rôle du nucléole dans la régulation de la progression du cycle cellulaire.

Au cours du cycle cellulaire, sont observées de nombreuses modifications post traductionnelles qui contrôlent une multitude d'activités

Certaines modifications telles que la sumoylation et la phosphorylation mettent en jeu des protéines nucléolaires.

SEN5 est une protéase qui élimine les chaînes SUMO (Small Ubiquitin like MOdifier) des protéines cibles. Cette protéase a été récemment identifiée et est localisée de façon majoritaire dans le nucléole. L'inactivation du gène codant cette protéase induit des défauts de la division cellulaire et une morphologie aberrante du noyau. Ces résultats suggèrent un rôle du nucléole dans la régulation des protéines sumoylées intervenant dans la progression de la division cellulaire (Di Bacco and Gill, 2006).

La phosphorylation réversible des protéines est la principale modification post-traductionnelle qui contrôle des événements clés au cours du cycle cellulaire. Chez la levure, Cdc14 est une phosphatase dont le rôle est crucial pour la sortie de mitose. Cette phosphatase est retenue dans le nucléole de la phase G1 jusqu'à la métaphase par la protéine Net1 qui fait partie du complexe RENT (REgulator of Nucleolar silencing and Telophase). Juste avant l'entrée en anaphase, Net 1 est phosphorylée et cdc14 est libérée dans le cytoplasme. (Azzam et al., 2004; Shou et al., 1999) où elle déphosphoryle la protéine Cdh1 qui fait partie d'un complexe qui à son tour dégrade les cyclines spécifiques de la mitose induisant ainsi la sortie de la mitose.

b) Le nucléole comme senseur de stress

Dans des conditions normales de croissance, le suppresseur de tumeur p53 est une protéine à temps de demi vie très court présente en quantité à peine détectable dans la cellule. L'exposition des cellules à divers stress (dommages à l'ADN, choc thermique, hypoxie..) induit la stabilisation de p53 qui est ensuite responsable d'une cascade d'évènements conduisant à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire.

La stabilité de p53 est régulée dans les cellules normales par les protéines HDM2 et p14ARF. HDM2 est une protéine ligase spécifique de p53, qui cible p53 vers le

protéasome expliquant les très bas niveaux de p53 dans les cellules en conditions normales de croissance. p14ARF est une protéine qui en interagissant avec p53 la séquestre dans le nucléole et empêche sa dégradation par le protéasome.

Lorsque les cellules sont exposées à un stress, l'expression de p14ARF est augmentée ce qui induit donc une augmentation du niveau de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire. Le nucléole agit comme un senseur de stress en stabilisant le suppresseur de tumeur p53.

c) Nucléole et biogenèse de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) :
exemple du complexe SRP (Signal Recognition Particle)

Ce complexe est responsable de la reconnaissance du peptide signal des protéines naissantes dont la destinée est d'être excrétées ou de faire partie de la membrane cellulaire. Le complexe SRP cible ces protéines vers un récepteur spécifique de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique. Le complexe SRP est constitué de 6 protéines et d'un ARN de 300 nucléotides. (Walter and Johnson, 1994) Ces deux composants du complexe SRP transitent par le nucléole des cellules de mammifères avant l'export du complexe dans le cytoplasme. (Jacobson and Pederson, 1998). Ces observations montrent un rôle potentiel du nucléole lors de l'assemblage et de la maturation du complexe SRP .

Considérant le nombre important de protéines nucléolaires codées par des ORF encore non identifiés, il est très probable que le nucléole nous dévoilera encore de nouvelles fonctions dans les années à venir.

II-2-4) Facteurs déterminant la structure et la localisation du nucléole :

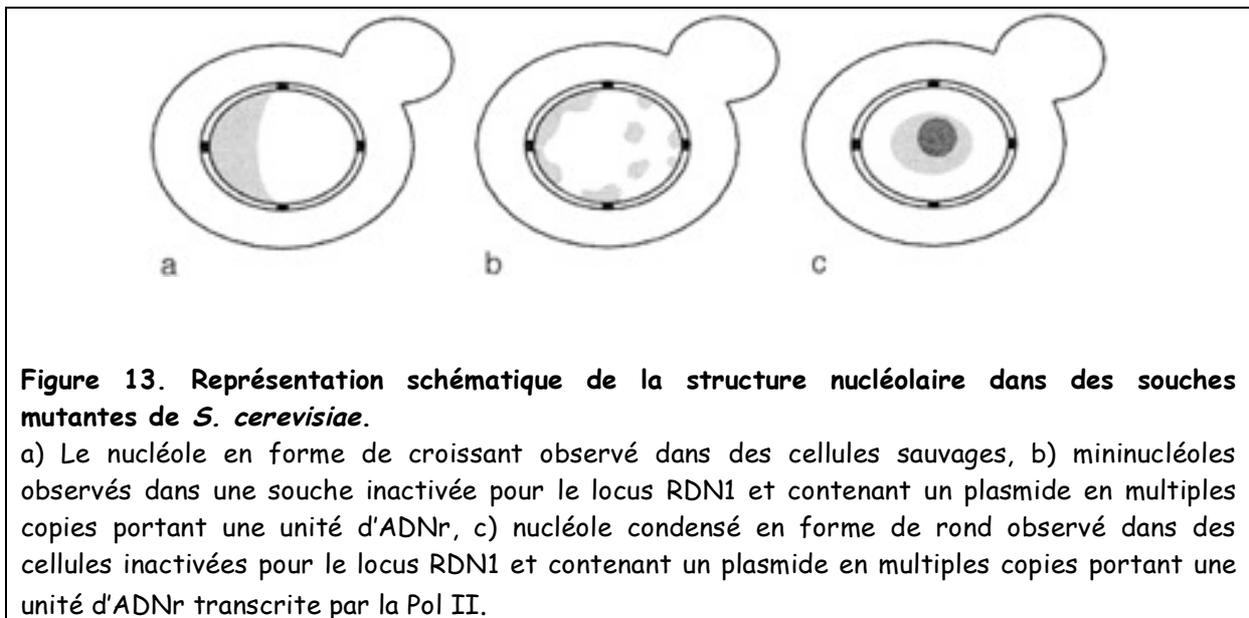
Chez la levure *S. cerevisiae*, le nucléole a une structure en croissant accolé à l'enveloppe nucléaire. L'équipe du Pr. Nomura (Université de Californie, Irvine, USA) a étudié la structure nucléolaire de plusieurs mutants du locus RDN1 et de la Pol I et a déterminé les éléments importants responsables de cette structure.

Dans une souche *rdnΔΔ* dans laquelle le locus RDN1 est inactivé et qui contient un plasmide porteur d'une copie d'ADNr transcrite par la Pol I, plusieurs petits nucléoles

distribués dans le noyau et localisés majoritairement à la périphérie du noyau sont observés. Par contre, dans une souche *rdn1Δ* contenant un plasmide porteur d'une copie d'ADNr sous le contrôle du promoteur galactose donc transcrite par la Pol II, ils observent un nucléole de forme ronde et qui n'a pas de contact avec l'enveloppe nucléaire (Oakes et al., 1998). (figure 13)

Ces résultats suggèrent que la présence d'un locus *RDN1* intact n'est pas suffisant à lui seul pour contrôler la morphologie et la localisation du nucléole au niveau de la périphérie nucléaire mais que la présence de la machinerie Pol I est également un élément important pour la morphologie et la localisation du nucléole.

Ce résultat est corroboré par le fait que le passage à température restrictive d'un mutant thermosensible de la sous-unité essentielle A190 induit la fragmentation du nucléole.



Des cellules de levure ayant un locus *RDN1* intact, contenant des mutations létales au niveau de la machinerie Pol I et qui se multiplient en transcrivant l'ADNr 35S par la Pol II à partir d'un plasmide présentent de multiples nucléoles loin de la périphérie nucléaire. (Oakes et al., 1993; Trumtel et al., 2000). Ces mininucléoles contiennent des protéines nucléolaires telles que Nop1 et Ssb1p impliquées dans la maturation et l'assemblage des ribosomes. Et dans ces souches, la machinerie de transcription de classe I est distribuée dans tout le noyau. Il est donc évident que les protéines impliquées dans la transcription spécifique par la Pol I telles que la Pol I elle-même,

Rrn3, UAF et le CF jouent un rôle primaire dans la détermination de la localisation nucléolaire alors que d'autres protéines impliquées dans la maturation de l'ARNr n'ont pas de rôle dans la détermination de la localisation du nucléole.

En résumé, la nature de la machinerie de transcription synthétisant l'ARNr35S et l'organisation du locus RDN1 sont les deux paramètres majeurs influençant l'organisation et la localisation du nucléole, même si ces deux paramètres ne sont pas essentiels à la formation d'un nucléole fonctionnel et à la synthèse de ribosomes.

III) Régulation de la transcription Pol I

Chez les organismes unicellulaires (pour lesquels métabolisme et croissance cellulaire sont intimement liés), le niveau de croissance est directement corrélé au niveau de transcription Pol I (Kief and Warner, 1981; Waldron, 1977; Waldron and Lacroute, 1975). Cette observation est également pertinente chez les eucaryotes supérieurs et il est maintenant clairement établi que croissance cellulaire et prolifération sont directement associées à des modifications du niveau de production des ribosomes (Ruggero and Pandolfi, 2003) ainsi que l'illustrent les liens existant entre le déroulement du cycle cellulaire et la biogenèse des ribosomes. Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, une augmentation de la synthèse d'ARNr et de la quantité de ribosomes sont requises pour la synthèse protéique accrue au cours de la phase S. De plus, la répression de l'activité et/ou de la synthèse des ribosomes semble nécessaire durant la phase M pour assurer une sortie correcte du cycle cellulaire (Grummt, 1999; Pyronnet and Sonenberg, 2001). Ainsi, des relations importantes existent entre cycle cellulaire et production des ribosomes, qui sont régulés par des mécanismes de contrôle cruciaux permettant la traduction des ARNm à un niveau adéquat pendant des fenêtres de temps précises du cycle. Il est d'ailleurs important de noter que plusieurs études ont démontré que les relations existant entre synthèse d'ARNr, biogenèse des ribosomes et cycle cellulaire étaient grandement affectées dans les cellules cancéreuses. En effet, plusieurs proto-oncogènes et suppresseurs de tumeurs (tels P53, RB, NPM, PTEN, S19, S6, DKC1...) ont récemment été impliqués dans la régulation de la biogenèse des ribosomes ou dans l'initiation de la synthèse protéique (Ruggero and Pandolfi, 2003).

La synthèse de l'ARNr 35S par la Pol I représentant 60% de l'activité transcriptionnelle totale dans des cellules en phase exponentielle de croissance (Rudra and Warner, 2004), la régulation de l'activité Pol I constitue par conséquent un des moyens de contrôle de la biogenèse des ribosomes et de modulation de la réponse des cellules aux variations des conditions de croissance.

III-1) Conditions de la régulation de la transcription Pol I

III-1-1) Régulation en fonction de la croissance cellulaire :

La transcription des gènes ribosomiques est dépendante du cycle cellulaire. Lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire, le métabolisme de la cellule est minimal et la synthèse du précurseur des ARNr est pratiquement nulle. (Grummt, 1981; Ju and Warner, 1994)

D'autres conditions entraînant l'arrêt de la croissance cellulaire, s'accompagnent également de l'arrêt de la transcription Pol I. Ainsi lorsque le milieu est carencé en un acide aminé essentiel, une répression coordonnée de la transcription de l'ADNr et des gènes des protéines ribosomales est observée (Grummt et al., 1976; Oliver and McLaughlin, 1977) Lors d'un arrêt de la croissance cellulaire induit par un choc thermique, la transcription par l'ARN polymérase I est également réprimée (Ghavidel and Schultz, 2001)

L'arrêt de la transcription de l'ADNr est bien évidemment réversible : une fois que les conditions de croissance optimales sont rétablies, la synthèse de l'ARNr 35S est rapidement restaurée.

III-1-2) La voie de sécrétion :

L'équipe du Pr Warner (Université de Médecine Albert Einstein, Bronx, États-Unis) a démontré en 1994 que l'inhibition de la voie de sécrétion conduisait à la répression de la synthèse de l'ARNr 35S et des protéines ribosomales (Mizuta, 1994). Lors de la recherche de mutants conditionnels défectifs pour la biogenèse des ribosomes chez la levure *S. cerevisiae*, plusieurs gènes impliqués dans la voie de sécrétion des protéines ont été identifiés. En analysant des mutants de toutes les étapes de la sécrétion des protéines, ils ont démontré que toute altération au niveau de cette voie entraînait la

répression de la transcription de l'ARNr 35S ainsi que celle des protéines ribosomales. De plus, en traitant des cellules par de la bréfeldine A, drogue bloquant la voie de sécrétion, ils ont également observé la répression de la synthèse des ARNr et des ARNm codant les protéines ribosomales.

Le lien existant entre la voie de sécrétion et la biogenèse des ribosomes n'est pas encore parfaitement élucidé. Selon le modèle actuel, la tension membranaire serait perçue par la protéine Wsc1 qui transduirait le signal à la protéine Pkc1. Il en résulterait d'une part la stimulation de la transcription des gènes codant les protéines constituant la membrane plasmique par une voie de type MAP kinase et d'autre part l'inhibition de la synthèse des composants du ribosome par une voie encore inconnue. (Nierras and Warner, 1999). (Figure 14)

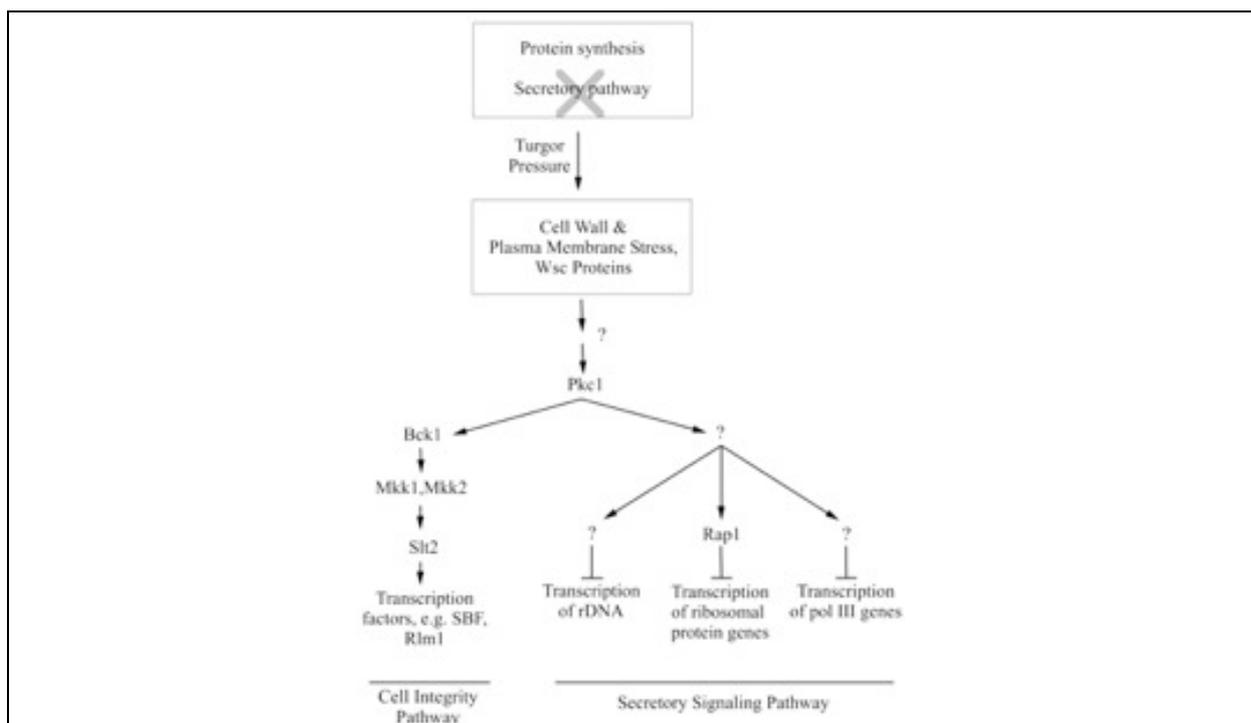


Figure 14. Modèle de la signalisation de la voie de sécrétion vers la répression transcriptionnelle des composants du ribosome :

Selon Li et al, 2000. La tension membranaire, générée par la synthèse protéique en l'absence de fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, active la voie de signalisation présentée. Le nombre d'étapes en aval de l'activation de Pkc1 est inconnu. Les flèches indiquent une activation et les barres une répression. (Li et al., 2000)

III-1-3) Régulation en cas de carence en nutriments : la voie TOR et rôle de la rapamycine :

La rapamycine est un antibiotique sécrété par les bactéries *Streptomyces hygroscopicus* qui ont été isolées pour la première fois en 1975 à partir d'un échantillon de sol prélevé sur l'île de Pâques. (Sehgal et al., 1975). Actuellement, cette drogue est utilisée comme immunosuppresseur lors de transplantations rénales, et lors de traitement de certains cancers.

Les recherches réalisées afin d'élucider le mécanisme d'action de cette drogue ont mené à la découverte de la voie TOR (Target of rapamycin). (Brown et al., 1994).

La rapamycine agit en se fixant sur une protéine hautement conservée FKBP12, puis le complexe rapamycine-FKBP12 se lie à la kinase TOR et inhibe son activité. Ce mécanisme d'action est conservé de la levure à l'homme. Les cibles de la rapamycine ont tout d'abord été découvertes chez la levure *S. cerevisiae*, il s'agit des kinases TOR1 et TOR2 (Heitman et al., 1991). Contrairement à tous les eucaryotes inférieurs qui comportent tous deux gènes TOR, les eucaryotes supérieurs en possèdent uniquement un. Des études biochimiques et des tests double hybride ont permis la découverte de l'homologue unique mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) chez les eucaryotes supérieurs également appelé FRAP, RAFT ou RAPT. Depuis sa découverte, la voie TOR a été largement étudiée et il est établi que c'est la voie centrale contrôlant la croissance cellulaire chez les eucaryotes (Schmelzle and Hall, 2000).

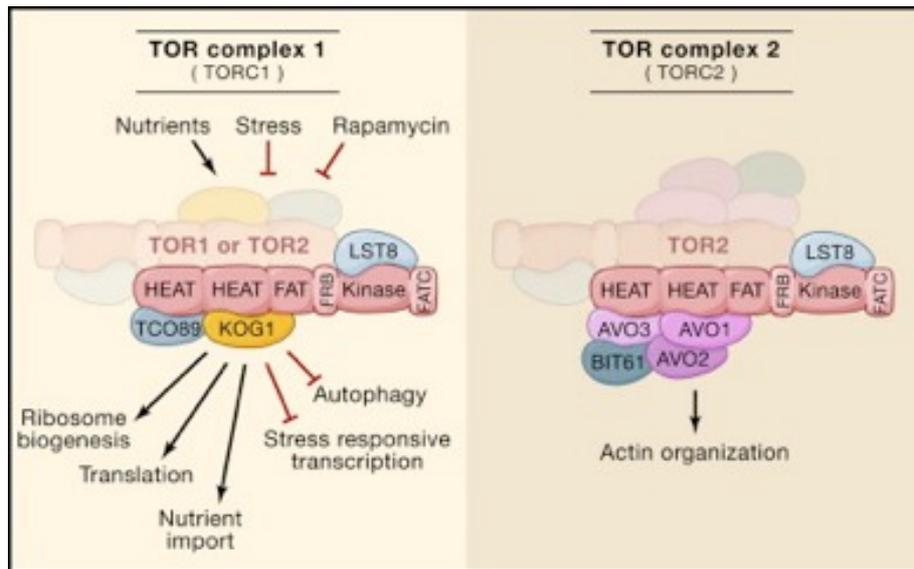


Figure 15. Les complexes TORC1 et TORC2 chez la levure *S. cerevisiae*

Ce schéma représente les complexes TORC1 et TORC2 avec leurs protéines associées, et les différents domaines fonctionnels des kinases TOR (HEAT, FAT, FRB, Kinase et FATC). TORC1 est le complexe de la voie TOR sensible à la rapamycine : il médie la signalisation qui couple les signaux de croissance cellulaire avec la croissance cellulaire effective. Les flèches noires représentent une activation et les flèches rouges une inhibition. Le complexe TORC2 est insensible à la rapamycine et est responsable de l'organisation du cytosquelette. D'après Wullschleger et al 2006.(Wullschleger et al., 2006)

Chez la levure *S. cerevisiae*, TOR1 et TOR2 s'associent à plusieurs protéines pour constituer les complexes TORC1 et TORC2. (Figure 15) (Loewith et al., 2002)

Chaque complexe contrôle des processus physiologiques distincts en réponse à la présence ou l'absence de nutriments.

Le complexe TORC1, sensible à la rapamycine, contrôle la croissance cellulaire en régulant plusieurs processus cellulaires tels que : la traduction, la transcription la biogenèse des ribosomes, le transport des nutriments et l'autophagie.(Wullschleger et al., 2006) et le complexe TORC2 contrôle l'organisation du cytosquelette en fonction du cycle cellulaire. Cette fonction est insensible à la rapamycine. (Schmidt et al., 1997). Cependant des études récentes ont montré que la rapamycine inhibait les fonctions du complexe TORC2 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Matsuo et al., 2007) et le complexe mTORC2 chez les mammifères dans des conditions particulières. (Sarbasov et al., 2006).

L'inhibition de la voie TOR par la rapamycine ou lors d'une carence en nutriments conduit à l'arrêt des cellules à la frontière G1/S et induit de multiples changements physiologiques caractéristiques des cellules carencées en nutriments tel que la réduction de la taille du nucléole. (Zaragoza et al., 1998). Chez la levure ainsi que chez les eucaryotes supérieurs, la voie TOR contrôle la biogenèse des ribosomes : l'inhibition de cette voie induit la répression de la transcription par la Pol II des gènes codant les protéines ribosomales, la répression de la transcription de l'ADNr35S par la Pol I et de l'ARN5S par la Pol III. (pour revue Mayer and Grummt, 2006). (figure 16)

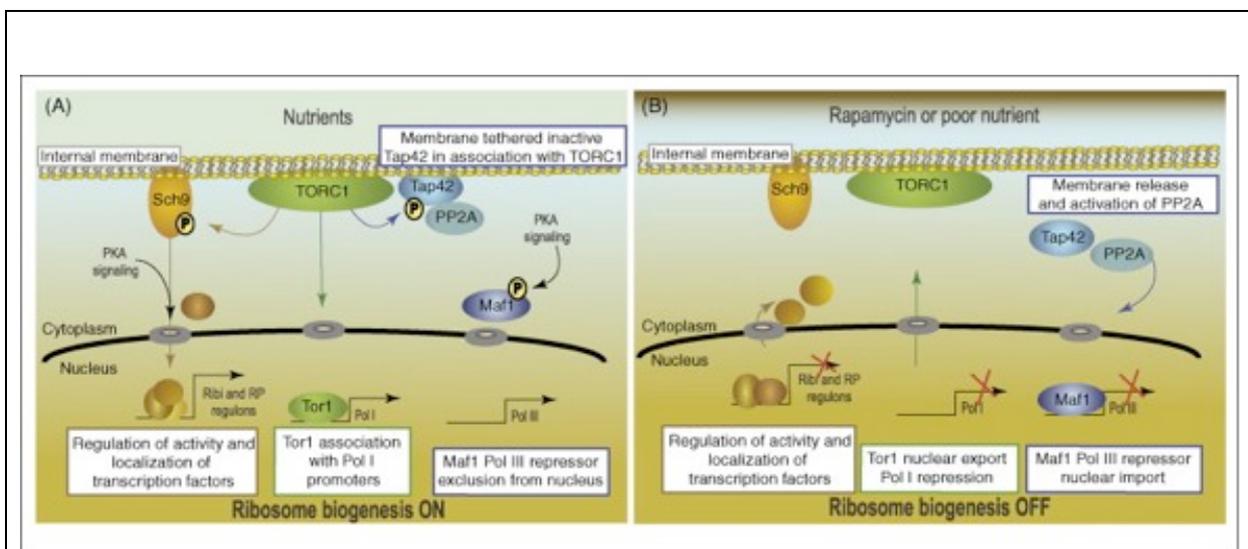


Figure 16. Régulation de la biogenèse des ribosomes par le complexe TORC1.

(A) En présence de nutriments, Tap42 est localisée au niveau de la membrane et associée à TORC1 : dans ces conditions, TORC1 phosphoryle Sch9 conduisant à la stimulation de l'expression des gènes codant les protéines ribosomales par la Pol II. TOR1 se localise au nucléole et s'associe avec le promoteur de l'ADNr. Enfin, MAF1 le répresseur de la transcription par la Pol III est localisé dans le cytoplasme. (B) lors d'une carence en nutriments ou lors d'un traitement à la rapamycine, la phosphorylation de Sch9 est inhibée et l'expression des protéines ribosomales est réprimée. La kinase TOR est exportée du noyau et Tap42 est déplacée de la membrane et agit en concert avec PP2A pour déphosphoryler MAF1 qui réprime alors la transcription Pol III. Les mécanismes gouvernant les localisations de la kinase TOR1 sont toujours inconnus. D'après Rohde JR et al 2008. (Rohde et al., 2008)

III-2) Mécanismes de la régulation de la transcription Pol I

La régulation de la transcription par l'ARN polymérase I peut se faire à deux niveaux : en régulant la proportion de copies d'ADNr accessibles à la machinerie de classe I ou en modulant le taux de transcription par la Pol I des copies d'ADNr.

III-2-1) Nombre de copies accessibles à la transcription Pol I

Le nombre de répétition en tandem des copies d'ADNr dans les génomes eucaryotes est instable, mais il est maintenu à un niveau moyen caractéristique de chaque espèce et de chaque type cellulaire (Rustchenko et al., 1993)

Dans les cellules de mammifères, le nombre de copies d'ADNr actives varie entre les différents types cellulaires comprenant le même génotype suggérant ainsi que l'ajustement du nombre de copies d'ADNr actives se fait pendant le développement et la différenciation cellulaire. Dans la majorité des cas, la différenciation cellulaire s'accompagne d'une diminution de la synthèse de l'ARNr (Reeder, 1999). Par exemple, pendant la spermatogenèse, lors du passage du stade diploïde au stade haploïde une réduction du nombre de copies d'ADNr actives est observée. A l'opposé, la stimulation des lymphocytes conduit à la division cellulaire et à l'augmentation de la synthèse de l'ADNr et du nombre de gènes ADNr actifs suggérant que des copies initialement fermées deviennent accessibles à la transcription (Haaf et al., 1991).

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'augmentation du nombre de copies d'ADNr (phénomène d'expansion) ou sa diminution (phénomène de contraction) s'effectuent par recombinaison homologue lors de la réplication de l'ADN (Johzuka et al., 2006; Kobayashi et al., 1998). Ces événements dépendent en grande partie de la présence de la protéine Fob1 et, en l'absence de cette protéine, aucune variation du nombre de copies d'ADNr n'est observée. Brièvement, le modèle mécanistique actuellement admis est le suivant : la propagation de la fourche de réplication est bloquée au niveau des sites RFB (Replication Fork Barrier) lorsque la protéine Fob1 est présente sur ces sites. Ce

blochage provoque des cassures de l'ADN qui sont réparées par recombinaison homologue. Lorsque cette recombinaison s'effectue de façon asymétrique, elle s'accompagne alors d'une variation du nombre de copies d'ADNr. (Figure 17)

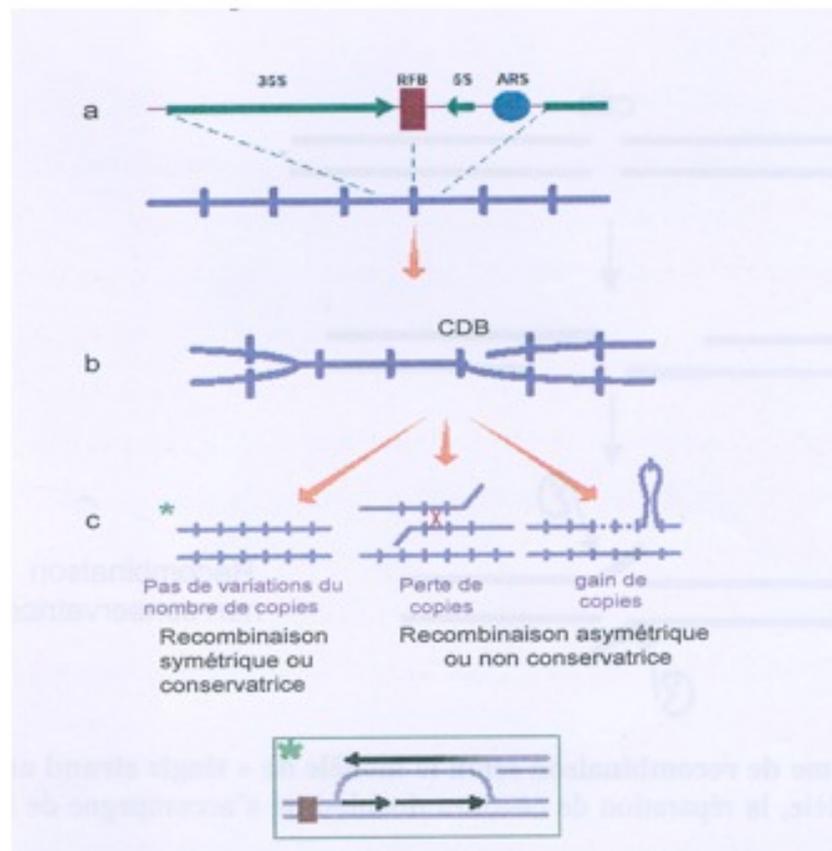


Figure 17. Mécanisme de recombinaison du locus RDN1.

(a) représentation d'une unité d'ADNr. La fourche de réplication, initiée au niveau d'une origine de réplication ARS et progressant dans le sens opposé à celui de la transcription Pol I, est bloquée au niveau du site RFB. Ce blocage stimule la formation de cassures double-brin (CDB). (b) La réparation de cette cassure peut être réalisée par recombinaison avec ou sans perte de copies d'ADNr.

Chez la levure *S. cerevisiae*, dans des cellules en phase exponentielle de croissance 50% des copies d'ADNr sont transcrites et en phase stationnaire ce pourcentage diminue jusqu'à 30% (Dammann et al., 1993). Ces résultats ont été obtenus grâce à des expériences de pontage au psoralène, qui sont basées sur le fait que les copies actives (de structure dite « ouverte » dont les nucléosomes sont espacés irrégulièrement) fixent différemment un agent intercalant : le psoralène (Conconi et al., 1989). Cependant, cette méthode ne permet pas de distinguer les copies ouvertes non transcrites des copies ouvertes et transcrites. En microscopie électronique, des

expériences de Miller spread (Miller and Beatty, 1969) permettent de distinguer les copies d'ADNr transcrites par leur structure en « arbre de Noël ».

Les mécanismes moléculaires permettant de réguler l'activation ou l'inactivation des copies d'ADNr portent sur la modification de la structure de la chromatine par la méthylation de l'ADN et par des modifications des histones (pour revue McStay and Grummt, 2008). Certaines équipes ont proposé que l'histone déacétylase Rpd3 était impliquée dans ce processus chez la levure (Sandmeier et al., 2002; Tsang et al., 2003). Une étude a démontré que l'inactivation du gène codant cette protéine empêche la fermeture des copies d'ADNr lorsque les cellules entrent en phase stationnaire (Sandmeier et al., 2002). Cependant le rôle de cette déacétylase dans la régulation de la transcription Pol I est beaucoup moins clair puisque cette même équipe montre également que dans une souche où le gène *RPD3* est inactivé et où 50% des copies d'ADNr demeurent ouvertes en phase stationnaire, la synthèse d'ARNr est quand même réprimée. En fait, il a été montré que la densité de polymérase I par gène d'ADNr 35S transcrit est très réduite (la densité de Pol I est réduite de 65% par rapport à la densité observée en phase exponentielle de croissance). De plus, les études menées sur l'implication de cette déacétylase dans le contrôle de la transcription Pol I dans le contexte de l'inhibition par la voie TOR donnent des résultats contradictoires. L'équipe de Zheng (Université du New Jersey, USA) propose l'implication de Rpd3 dans la régulation de l'activité Pol I lors de l'inhibition de la voie TOR. Par contre, l'équipe du Pr Nomura (Université de Californie, Irvine, USA) montre clairement que dans une souche ne possédant que 42 copies d'ADNr, il n'y a pas de fermeture des copies d'ADNr en réponse à un traitement à la rapamycine (French et al., 2003) et que l'histone Rpd3 n'est pas requise pour l'inhibition de la transcription Pol I lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire.

La vision actuelle de la régulation de la transcription Pol I en fonction de la croissance cellulaire est la suivante : le processus d'ouverture/ fermeture des copies d'ADNr n'est pas impliqué dans la régulation de la transcription Pol I sur le court terme.

Cette régulation a lieu au niveau des gènes actifs et repose sur le taux de transcription de ces copies plutôt que sur la régulation du nombre de copies d'ADNr. (French et al., 2003).

III-2-2) Taux de transcription Pol I des copies d'ADNr

a) Association/dissociation du complexe PolI-Rrn3

Le facteur clé dans la régulation de la transcription Pol I est le facteur Rrn3/TIF-IA. Comme nous l'avons déjà mentionné, celui-ci est strictement requis pour l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I, les complexes Pol I-Rrn3 étant la seule forme de l'enzyme compétente pour l'initiation. Chez la levure, en phase stationnaire de croissance, le complexe PolI-Rrn3 n'est plus détectable alors que les deux partenaires Pol I et Rrn3 sont toujours présents dans les cellules (Milkereit and Tschochner, 1998). De nombreuses études ont montré que l'association/dissociation du complexe Pol I-Rrn3 est la cible de différentes voies de régulation qui lient l'activité cellulaire aux conditions environnementales. C'est chez la souris que les modifications du facteur TIF-IA sont les mieux décrites. TIF-IA est une protéine qui présente plusieurs sites de phosphorylation, et les signaux affectant le métabolisme de la cellule conduisent à des modifications de l'état de phosphorylation de cette protéine (Zhao et al., 2003). Lorsque les cellules sont soit traitées à la cycloheximide (antibiotique inhibant la synthèse protéique), soit en conditions de carence en nutriments ou de confluence cellulaire, le facteur TIF-IA est hypophosphorylé et incapable de se lier à la Pol I (Yuan et al., 2002).

La voie TOR régule également l'association/dissociation du complexe PolI/TIF-IA : l'inactivation de la voie TOR par la rapamycine conduit à l'hypophosphorylation de la sérine 44 et à l'hyperphosphorylation de la sérine 199 induisant ainsi l'inactivation du facteur TIF-IA et l'empêchant de se lier à la Pol I. De plus, le traitement à la rapamycine entraîne la délocalisation de TIFI-A du noyau vers le cytoplasme. L'activation de la voie des MAPK par des facteurs de croissance, induit la phosphorylation du résidu S649 de TIF-IA. La mutation de ce résidu en alanine inactive

le facteur TIF-IA, inhibe la synthèse de pré-ARNr et induit un retard de croissance. (Mayer et al., 2004; Zhao et al., 2003).

TIF-IA est également phosphorylé par la kinase JNK (c-Jun N terminal Kinase) sur la thréonine 200. Cette phosphorylation prévient l'interaction de ce facteur avec la Pol I et avec le facteur TIF-IB/ SL1, empêchant ainsi la formation du complexe d'initiation. (Mayer et al., 2005)

Chez la levure *S. cerevisiae* il est également proposé que l'inhibition de la voie TOR par la rapamycine empêche la formation du complexe PolI-Rrn3 (Claypool et al., 2004) . Les sérines phosphorylées du facteur TIF-IA de souris ne sont pas conservées chez le facteur Rrn3 de levure. Une étude montre que ce serait plutôt l'état de phosphorylation de la Pol I qui jouerait un rôle dans l'association/ dissociation de la Pol I avec le facteur Rrn3 (Fath et al., 2001). Mais, de façon surprenante, l'analyse des différents résidus phosphorylés au sein de la Pol I montre que ces phosphorylations n'ont aucun rôle lors de l'assemblage de la Pol I ou lors d'une des étapes essentielles de la synthèse de l'ARNr. Les auteurs ont étudié les effets de chaque mutation d'un site de phosphorylation de la Pol I individuellement. Il est alors possible qu'une combinaison de plusieurs phosphorylations soit requise pour l'association/dissociation du complexe Pol I-Rrn3, ou que le ou les sites cruciaux de phosphorylation impliqués dans ce mécanisme n'aient pas encore été identifiés (Gerber et al., 2008). Les récentes études sur la localisation cellulaire du complexe TORC1 chez la levure montrent que ce complexe est localisé dans le cytoplasme et dans le noyau où il se lie au promoteur de l'ADNr 35S . Ces résultats permettent de suggérer que le facteur Rrn3 pourrait être la cible de phosphorylation par ce complexe en réponse à la rapamycine (Tsang and Zheng, 2007).

b) Contrôle de la formation du PIC

La transcription par l'ARN polymérase I peut être également régulée au niveau de la formation du complexe de préinitiation soit par des modifications post- traductionnelles soit par l'augmentation du niveau intracellulaire des composants du PIC.

C'est encore chez la souris que ces mécanismes sont le plus étudiés: il a été proposé que la fixation du facteur SL1 sur le promoteur pouvait être régulée par acétylation. En effet l'acétylation de la sous unité TAFI 68 de SL1 augmente la liaison de ce facteur sur

le promoteur de l'ADNr et stimule ainsi la transcription par la Pol I. (Muth et al., 2001). De plus, l'activation de la voie Ras-MAPK par le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) conduit à une augmentation du niveau de TBP dans la cellule ce qui conduit à la stimulation de la transcription par les ARN polymérases I et III (Zhong et al., 2004).

Les phosphorylations du facteur UBF peuvent aussi affecter son interaction avec l'ADN d'une part ou avec les autres membres du complexe de préinitiation d'autre part. *In vitro*, la phosphorylation de résidus sérine du domaine C-terminal d'UBF par la caséine Kinase 2 (CK2) augmente son interaction avec SL1 et contribue ainsi à l'activation de la transcription par la Pol I. (Comai, 2004).

L'interaction entre UBF et SL1 est également favorisée par la phosphorylation du domaine C-terminal d'UBF en réponse à l'activation de la voie TOR, et l'expression d'UBF est aussi augmentée dans ce cas (Hannan et al., 2003).

L'interaction entre le facteur UBF et l'ADNr est également affectée par la phosphorylation du domaine C-terminal d'UBF par la voie ERK-MAPK. (Stefanovsky et al., 2001b).

Le facteur UBF semble être limitant dans certaines cellules et la transcription Pol I peut donc être régulée par le niveau d'expression de ce facteur. En effet, la surexpression d'UBF est observée juste avant l'augmentation de la synthèse d'ADNr dans des lymphocytes stimulés par des facteurs mitogènes, et l'expression d'UBF décroît dans des cellules en cours de différenciation (Cabart and Kalousek, 1998)

En fait, il a été montré qu'UBF est surexprimé lors d'hypertrophie cardiaque et lors de cancer de foie, permettant ainsi des niveaux très importants de synthèse d'ADNr (Brandenburger et al., 2001; Huang et al., 2002).

Il a été proposé par l'équipe de Tom Moss (Université de Laval, Québec, Canada) que la transcription chez les mammifères est également régulée lors de la phase d'élongation via la phosphorylation d'UBF et le remodelage de la chromatine. (Stefanovsky et al., 2006). Suite à la stimulation de la synthèse de l'ADNr 45S par le facteur EGF, les auteurs n'ont pas observé d'augmentation de la densité de Pol I sur l'ADNr mais

l'augmentation de la vitesse d'élongation de la Pol I qui était proportionnelle à l'augmentation du niveau d'ARNr 45S observé. La phosphorylation d'UBF suite à la stimulation par EGF régule directement l'étape d'élongation en induisant le remodelage de la chromatine au niveau des gènes d'ADNr. En effet, le même groupe avait déjà démontré que la phosphorylation d'UBF par ERK affecte la structure dite « enhancesome ». Cette structure (déjà décrite dans le paragraphe I-2-1) bloque le passage des complexes Pol I en élongation et le remodelage de cette structure par la phosphorylation d'UBF permet donc une élongation continue. C'est la première étude qui montre que le facteur UBF contrôle l'accessibilité de la chromatine de l'ADNr en fonction de la croissance cellulaire.

Chez la levure *S. cerevisiae*, aucune étude n'a encore mis à jour de régulation de la formation du PIC par des modifications du CF, homologue fonctionnel de SL1/TIF-B. Quant au facteur UAF, il semble que ce complexe soit constitutivement associé aux promoteurs des copies actives d'ADNr et il a été montré que l'inactivation de la voie TOR par la rapamycine n'a pas d'effet sur l'occupation des promoteurs de l'ADNr 35S par UAF (Claypool et al., 2004).

Le facteur Hmo 1 est impliqué dans la transcription Pol I : il interagit avec des sous-unités non essentielles de la Pol I, est localisé dans le compartiment nucléolaire et cette protéine à domaines HMG possède de fortes similarités fonctionnelles avec le facteur UBF des mammifères (Gadal et al., 2002). Récemment, il a été montré que le facteur HMO1 s'associe à l'ADNr 35S, uniquement sur les copies actives et reste associé à l'ADN une fois que la Pol I quitte la matrice, (Merz et al., 2008). Cependant la signification de sa présence sur ces copies actives ainsi que son rôle dans la régulation de la transcription Pol I restent à élucider.

c) Contrôle de la transcription en fonction du cycle cellulaire

1) Chez les mammifères :

Chez les mammifères, la transcription de l'ADNr est régulée en fonction du cycle cellulaire : la transcription Pol I est maximale pendant les phases S et G2, réprimée pendant la mitose, et augmente graduellement pendant la phase G1.

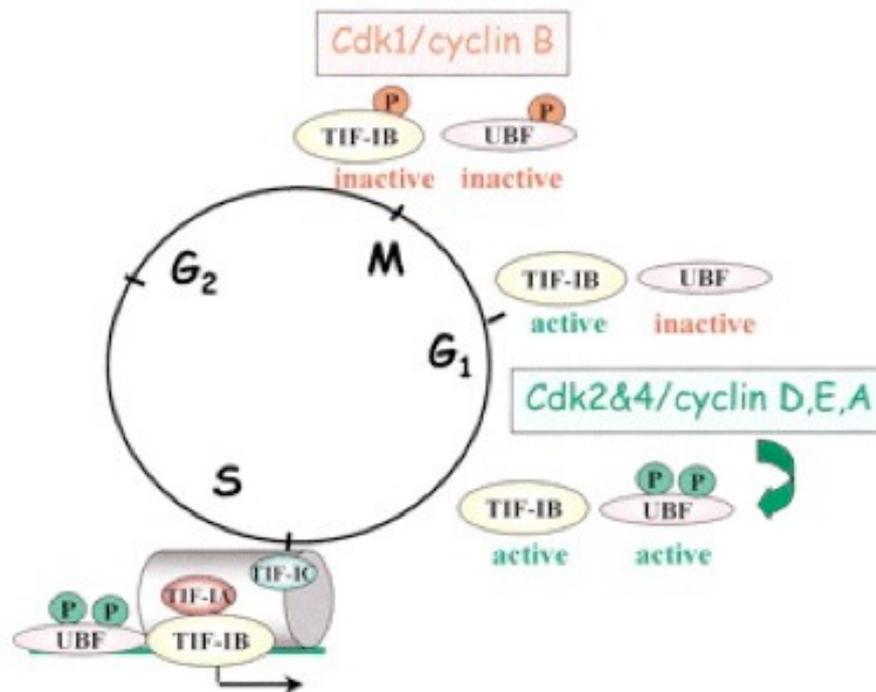


Figure 18. Régulation de la transcription Pol I en fonction du cycle cellulaire (modèle murin)
 La régulation de l'activité des facteurs TIF-IB/SL1 et UBF passe par différents états de phosphorylation. Au début de la mitose, la phosphorylation d'UBF et de TIF-IB/SL1 conduit à leur inactivation. En sortie de mitose, l'activité transcriptionnelle Pol I demeure basse malgré la restauration de l'activité de TIF-IB/SL1. UBF est activé pendant la phase G1 par phosphorylation de la sérine 484 par le complexe cdk4/cycline D et la phosphorylation de la sérine 388 par les complexes cdk2/cyclines E et A.

Tout le long de la mitose, les facteurs SL1 et UBF restent associés au promoteur de l'ADNr et la Pol I est également associée à l'ADNr pendant une grande partie de la mitose (Jordan et al., 1996; Leung et al., 2004).

La répression de la transcription Pol I pendant la mitose est due à la phosphorylation de la sous-unité TAFI 110 du complexe SL1 par le complexe cdk1/cycline B, qui empêche ainsi l'interaction de SL1 avec UBF (Heix et al., 1998; Kuhn et al., 1998).

Les mécanismes permettant de réactiver la transcription à la fin de la mitose sont encore inconnus mais la phosphatase cdc14b est un candidat proposé pour réverser les phosphorylations du complexe cdk1/cycline B. Cette phosphatase séquestrée dans le nucléole sous sa forme inactive pendant tout le cycle cellulaire, est libérée dans le cytoplasme en sortie de mitose (Mailand et al., 2002).

En début de phase G1, la transcription Pol I demeure à un niveau très bas malgré la restauration de l'activité du complexe TIF-IA/SL1. Dans ce cas, c'est le facteur UBF qui est l'élément clé permettant la réactivation de la transcription Pol I. Le facteur UBF est alors phosphorylé par les complexes cdk4/cyclineD1 et cdk2/cyclines E et A permettant ainsi la reprise de la transcription Pol I.

Une étude publiée récemment, visant à étudier la dynamique des facteurs impliqués dans la transcription par la Pol I a montré que durant la phase S, lorsque la transcription Pol I est très active, le facteur TIF-IA et PAF 53 ont un temps de résidence au niveau du promoteur beaucoup plus élevé qu'en phase G1. Cette interaction prolongée des facteurs de transcription avec le promoteur affecte la dynamique des sous-unités de la Pol I qui à leur tour restent plus longtemps au niveau du promoteur. La conséquence est l'augmentation de la probabilité que ces différentes sous-unités soient assemblées en un complexe Pol I fonctionnel, et donc l'augmentation de la probabilité d'entrée en phase d'élongation processive. Ces résultats suggèrent donc que la dynamique des facteurs de transcription au niveau du promoteur de l'ADNr constitue un moyen de réguler la transcription Pol I (Gorski et al., 2008).

2) Régulation de la transcription Pol I en fonction du cycle cellulaire chez la levure :

Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été proposé que la transcription Pol I était continue pendant la mitose (Elliott and McLaughlin, 1979). Cependant des études récentes montrent l'implication de la phosphatase Cdc14 dans l'inhibition de la transcription Pol I pendant l'anaphase. (Clemente-Blanco et al., 2009).

Cette étude montre que l'activité phosphatase de Cdc14 est requise pour l'inhibition de la transcription Pol I *in vivo* et *in vitro*. Cette inhibition s'accompagne de la délocalisation de la sous-unité A43 du nucléole vers le cytoplasme, alors que la sous-unité A190 n'est pas délocalisée. Les auteurs suggèrent que Cdc14 pourrait inhiber la transcription Pol I en déstabilisant des sous-unités spécifiques de l'enzyme.

Par cette étude, les auteurs démontrent que chez la levure, comme chez la plupart des eucaryotes, l'inhibition de la transcription Pol I avant la ségrégation des chromosomes est un élément pré requis pour assurer la condensation des chromosomes et une bonne séparation du génome.

d) Répression de la transcription Pol I par les suppresseurs de tumeur : pRb et p53

Les gènes codant les suppresseurs de tumeurs sont souvent mutés dans de nombreux cas de cancers humains. Ces protéines constituent des médiateurs centraux dans l'arrêt du processus de transformation des cellules.

La protéine pRB s'accumule dans les nucléoles des cellules différenciées, et réprime la transcription de l'ADNr *in vitro* et *in vivo*, en interagissant avec les domaines HMG 1 et 2 du facteur UBF (Cavanaugh et al., 1995; Hannan et al., 2000; Voit et al., 1997).

Il a également été montré que le suppresseur de tumeur p53 inhibe la transcription Pol I *in vivo* et *in vitro*. P53 interagit avec deux sous-unités du complexe SL1 : TBP et TAFI 110 empêchant ainsi la formation du complexe d'initiation. (Budde and Grummt, 1999; Zhai and Comai, 2000).

PREAMBULE : LA PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE

I) Le contexte scientifique : dérégulation de la transcription Pol I, problématique et premières observations

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans la continuité d'un projet initié voilà quelques années et qui visait à caractériser les conséquences d'une dérégulation spécifique de la transcription Pol I sur la physiologie de la cellule. En particulier, nous souhaitons déterminer si le niveau d'activité Pol I influençait l'expression des gènes (ou de certains gènes) de classe II et III.

Quelles informations pouvait-on tirer d'une telle étude ? En théorie, elle devrait nous permettre d'aborder plusieurs aspects extrêmement intéressants de la physiologie de la cellule :

A) Existe-t-il une homéostasie de la transcription Pol I ? Quelles sont les conséquences morphologiques et physiologiques pour la cellule d'un niveau trop élevé de synthèse d'ARNr *in vivo*? Il a été proposé qu'une dérégulation de la transcription Pol I pouvait constituer chez l'homme une étape précoce de la cancérogenèse (Rosenwald, 1996). Des souches de levure présentant un niveau de synthèse de l'ARNr accru ont-elles alors tendance à proliférer de façon anarchique ? Plusieurs données préliminaires suggèrent que certains mécanismes de répression de la synthèse de l'ARNr sont conservés entre la levure et l'homme. Ainsi, peut-être sera-t-il possible de déterminer si une dérégulation de la transcription Pol I dans les cellules humaines peut ou non causer une cancérogenèse (un point fondamental qui n'a jusqu'à présent jamais été éclairci et qui constituerait le pendant exact des évidences démontrant une altération de la transcription Pol I dans les cellules cancéreuses)

B) Une souche de levure possédant un système de transcription Pol I dérégulé en phase stationnaire sera un outil précieux pour étudier la co-régulation entre les trois systèmes transcriptionnels, en particulier en ce qui concerne les composants requis pour la biogenèse des ribosomes. Dans des cellules sauvages, l'entrée en phase stationnaire s'accompagne en fait d'une répression quasi-totale des transcriptions Pol I, Pol II et Pol

III (Waldron and Lacroute, 1975). Par ailleurs, la synthèse coordonnée de transcrits de classe I et de classe III a été observée dans de nombreuses conditions. Dans des conditions stables de croissance ralentie, les cellules produisent des quantités moindres d'ARNr et d'ARNt (Waldron, 1977). Dans des conditions affectant la croissance cellulaire de façon transitoire, une co-régulation est également observée. La carence azotée induit un arrêt rapide de la synthèse des ARNr et des ARNt (Oliver, 1997). Lors de l'addition rapide d'un nutriment limitant, la synthèse de ces deux classes d'ARN est également augmentée (Kief and Warner, 1981; Ludwig et al., 1977; Waldron, 1977). Dans certaines conditions, un découplage entre les transcriptions Pol I et Pol III peut cependant être observé. C'est notamment le cas lors d'une carence en acides aminés (réponse stringente), pendant laquelle la diminution de la synthèse de l'ARN ribosomique est très sensiblement supérieure à celle de la synthèse des ARN de transfert.

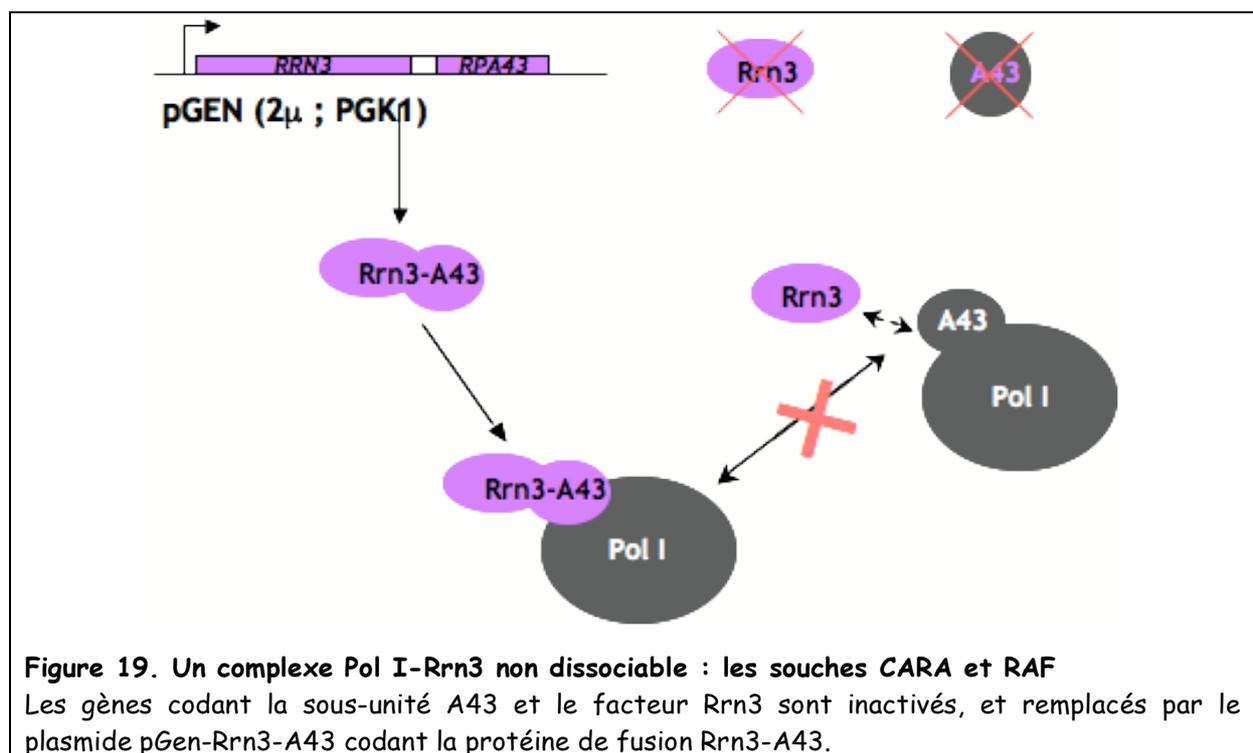
II) Les bases expérimentales de l'étude : la souche de levure CARA

Comment déréguler spécifiquement *in vivo* la transcription Pol I dans des cellules de levure? A priori, deux possibilités sont envisageables : soit réprimer de façon spécifique l'activité Pol I dans des conditions où cette enzyme est active, soit déréguler cette même activité dans des conditions de répression de la transcription Pol I. C'est vers cette seconde possibilité que nous nous sommes tournés puisqu'une diminution de l'activité Pol I impacte directement le temps de génération des cellules, rendant très difficile la distinction entre les effets directs et indirects que pourrait avoir cette action sur les deux autres machineries transcriptionnelles nucléaires.

Les données disponibles quant aux mécanismes de répression de la transcription Pol I chez la levure démontrent le rôle clef de la stabilité du complexe Pol I-Rrn3. S'il est vraisemblable que ces étapes font intervenir des modifications post-traductionnelles réversibles du facteur Rrn3 et/ou de la Pol I (cf. Introduction, partie III-2-2-a), la nature de ces modifications (et donc les enzymes impliquées) n'est pour l'instant pas établie chez *S. cerevisiae*.

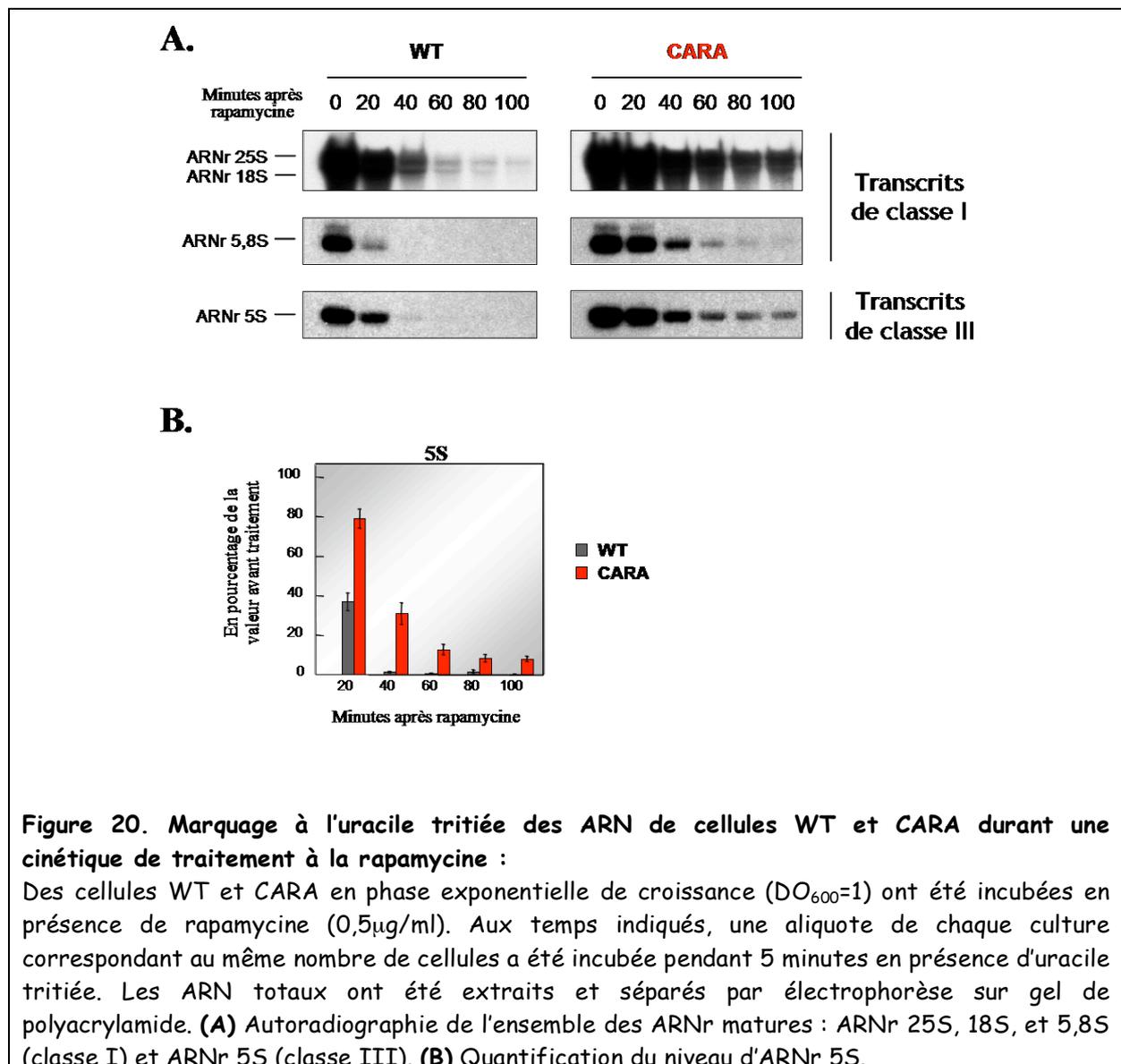
Nous avons donc décidé de faire produire par les cellules de façon constitutive un complexe Pol I-Rrn3 non dissociable. Pour cela, nous avons utilisé les résultats d'une étude précédente réalisée au laboratoire par G. Peyroche qui avait démontré que la cible

d'interaction majeure du facteur Rrn3 avec la Pol I était la sous-unité A43 de l'enzyme (Peyroche et al., 2000)(voir Introduction, partie I-2-1). Nous avons donc remplacé les gènes codant Rrn3 et la sous-unité A43 par un gène codant la protéine de fusion Rrn3-A43. Le gène codant la protéine chimère Rrn3-A43 a été introduit entre les sites de restriction BamH1 et EcoRI du vecteur multi-copies pGen pour donner le plasmide pGen-Rrn3-A43. Les souches de levure sauvages YPH500 et YPH499, correspondant aux deux types sexuels α et a respectivement dans lesquelles les gènes essentiels *RRN3* et *RPA43* codant le facteur Rrn3 et la sous-unité A43 ont été invalidés par recombinaison homologue (Longtine et al., 1998) (figure 19) ont été transformées avec ce plasmide. Ces souches mutantes nommées CARA (pour « Constitutive Association of Rrn3 and A43 ») et RAF sont viables et possèdent le même temps de génération qu'une souche isogénique sauvage. Les souches contrôles, appelées WT dans le texte, ont été construites en transformant les cellules YPH499 et YPH500 par le plasmide pGen vide.

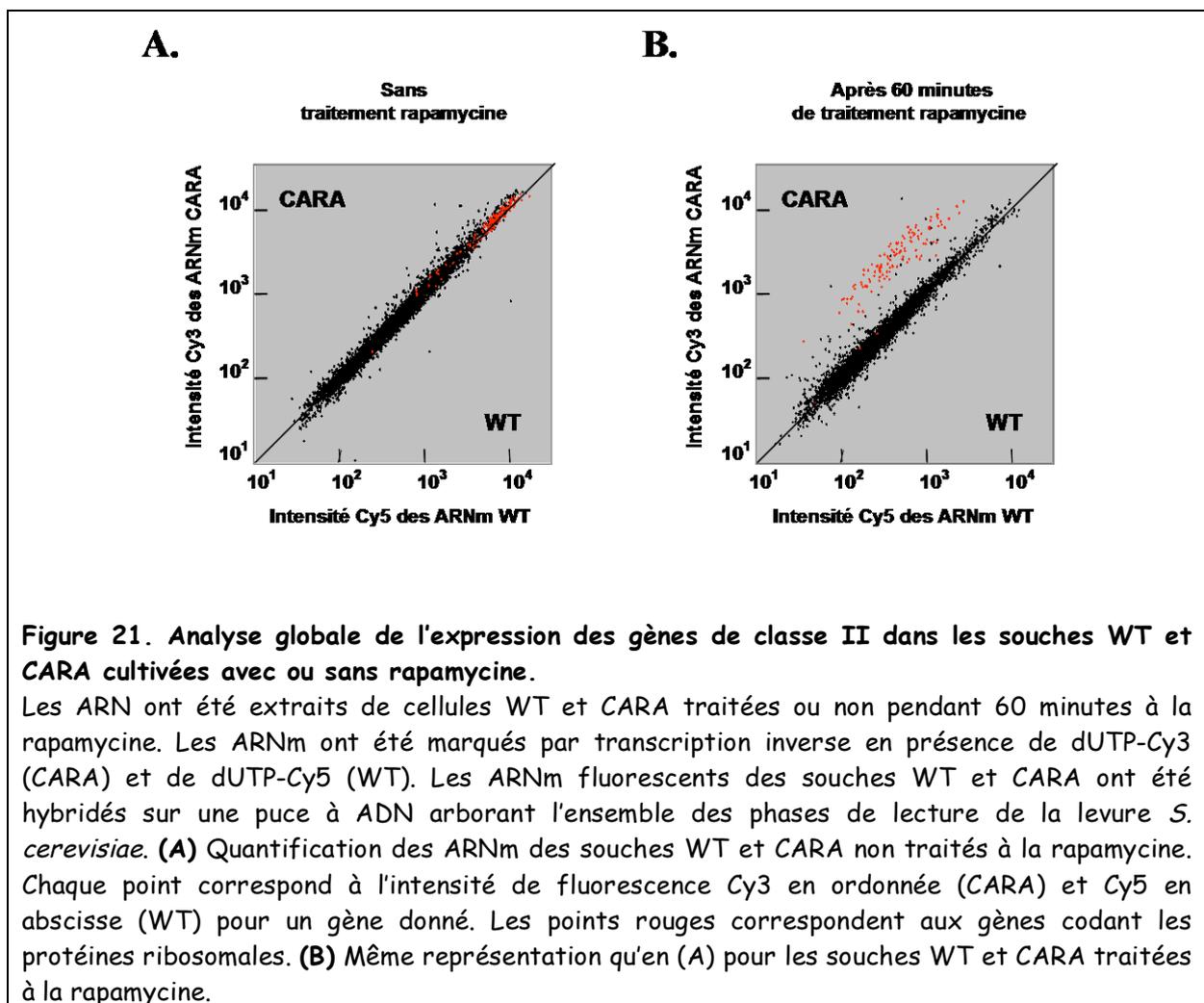


Il a d'abord été montré au laboratoire que la protéine de fusion Rrn3-A43 était assemblée de façon stable et stoechiométrique au sein de la Pol I (PolI CARA), et qu'une molécule d'enzyme purifiée contenant cette fusion mimait fonctionnellement un complexe Pol I-Rrn3 non dissociable. Nous avons ensuite vérifié si les souches mutantes

étaient dérégulées pour la transcription Pol I comme nous l'avions envisagé. La réponse transcriptionnelle de cellules *CARA* à différentes conditions de stress, et en particulier à un traitement à la rapamycine, a été étudiée. Cette drogue est un inhibiteur puissant et spécifique des kinases TOR (Target Of Rapamycin), et mime des conditions de carence en nutriments (entrée en phase stationnaire) (Crespo and Hall, 2002). Les conséquences d'un tel traitement sur les cellules sont donc pleïotropes, mais d'un point de vue transcriptionnel, on observe une très forte répression des trois systèmes transcriptionnels (Powers and Walter, 1999; Zaragoza et al., 1998). Au sein de la transcripton Pol II, on observe une modification importante du schéma d'expression des ARNm au sein d'une baisse sensible du niveau de transcription Pol II (Preiss et al., 2003; Shamji et al., 2000).



Comme espéré, la répression rapamycine-dépendante de la transcription Pol I est fortement atténuée dans les cellules *CARA* par rapport aux cellules sauvages (Figure 20). De façon surprenante, le niveau de l'ARNr 5S (synthétisé par la Pol III) est dérégulé de façon concomitante à la transcription Pol I (Figure 20). Le résultat le plus remarquable fut cependant la démonstration que cette atténuation de la répression de l'activité Pol I s'accompagnait d'une dérégulation partielle de la transcription Pol II, qui était limitée aux gènes codant les protéines ribosomiques (Figure 21).



Enfin, il a été montré que pendant le traitement à la rapamycine, l'accumulation relative des composants du ribosome dans les cellules *CARA* conduisait à une augmentation du niveau de ribosomes assemblés (comparativement aux cellules contrôles sauvages).

Ces données (Chedin et al., 2007; Laferte et al., 2006) constituent la première démonstration de l'existence d'une communication entre les trois machineries transcriptionnelles nucléaires, restreinte à la synthèse des composants du ribosome. Elles suggèrent de plus que le niveau d'activité de la transcription Pol I est un paramètre crucial du contrôle du niveau de biogenèse des ribosomes.

Parallèlement à ces résultats, Arnaud Laferté et Stéphane Chédin ont fait des observations préliminaires au laboratoire suggérant que la localisation sub-cellulaire de la Pol I pendant des temps courts (<1h) de traitement à la rapamycine était affectée dans les cellules CARA. Mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de ces données et s'est organisé autour de deux axes principaux :

- i) Le premier concerne les liens existant entre localisation cellulaire de la Pol I et activité de synthèse de l'ARNr. J'ai cherché plus précisément à déterminer les conséquences de la non-dissociation du complexe Pol I-Rrn3 sur l'interaction de l'enzyme avec l'ADNr dans des conditions de répression de l'activité Pol I. De façon plus globale, ces données m'ont conduite à essayer de déterminer si le maintien de l'intégrité du nucléole nécessitait ou non une transcription Pol I active.
- ii) Le second concerne l'analyse mécanistique de la transcription Pol I. Très peu de données sont en effet disponibles quant à l'analyse des étapes élémentaires du cycle transcriptionnel de cette enzyme. Il est évident que l'absence d'un système de transcription spécifique *in vitro* reconstitué à partir des différents composants de la machinerie de transcription de classe I est un frein important pour de telles études. La comparaison des propriétés mécanistiques de la Pol I Wt (complexe Pol I-Rrn3 dissociable) et de la Pol I CARA (complexe Pol I-Rrn3 non dissociable) permettra cependant d'obtenir des informations précieuses quant au rôle de la dissociation du facteur Rrn3 après l'initiation de la transcription par la Pol I.

Résultats et discussion

I) Relation entre activité Pol I et structure du nucléole

I-1) Etude de la localisation de la Pol I dans des cellules WT et CARA lors d'un traitement à la rapamycine

Nous avons dans un premier temps étudié par immunocytochimie la localisation de la Pol I dans des cellules WT et CARA lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine. Rappelons qu'en l'absence de rapamycine, cette protéine a une localisation strictement nucléolaire dans des cellules en phase exponentielle de croissance.

Les cellules sont récoltées aux différents temps de la cinétique (0, 30, 120 et 240 minutes après l'ajout de la rapamycine) fixées au formaldéhyde (1% final), partiellement digérées à la zymolyase, puis incubées avec un anticorps polyclonal dirigé contre A190 la plus grande sous-unité de la Pol I.

Après analyse des cellules par microscopie à fluorescence, nous observons qu'au temps 0 de la cinétique, le signal généré par les anticorps anti-Pol I dans les souches WT et CARA forme une structure en croissant situé à l'un des deux pôles du noyau, caractéristique de la structure du nucléole chez la levure. Dans les cellules sauvages, dès 30 minutes de traitement à la rapamycine, nous observons un signal diffus dans le noyau qui correspond à une délocalisation de la Pol I du nucléole comme décrit dans la littérature (Oakes et al., 2006; Tsang et al., 2003).

Dans la souche CARA, la localisation de la Pol I ne semble pas affectée par la rapamycine pendant toute la durée du traitement (jusqu'à 4h) (Figure 22). Des résultats identiques pour les cellules CARA et Wt ont été obtenus en utilisant des anticorps dirigés contre d'autres sous-unités de Pol I (données non montrées).

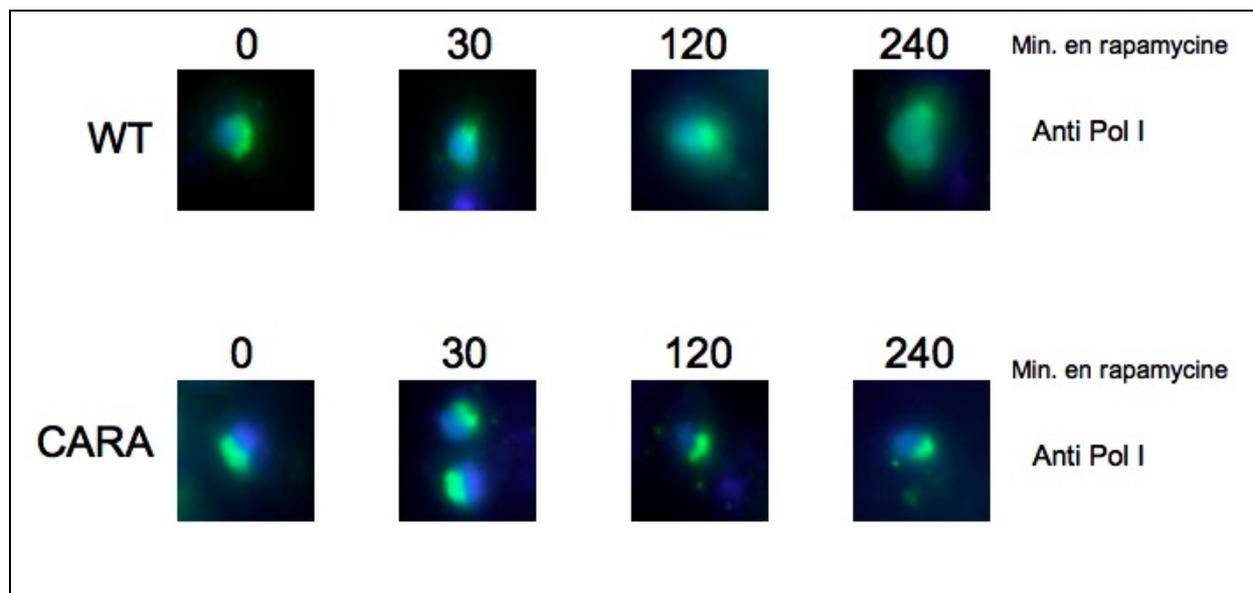
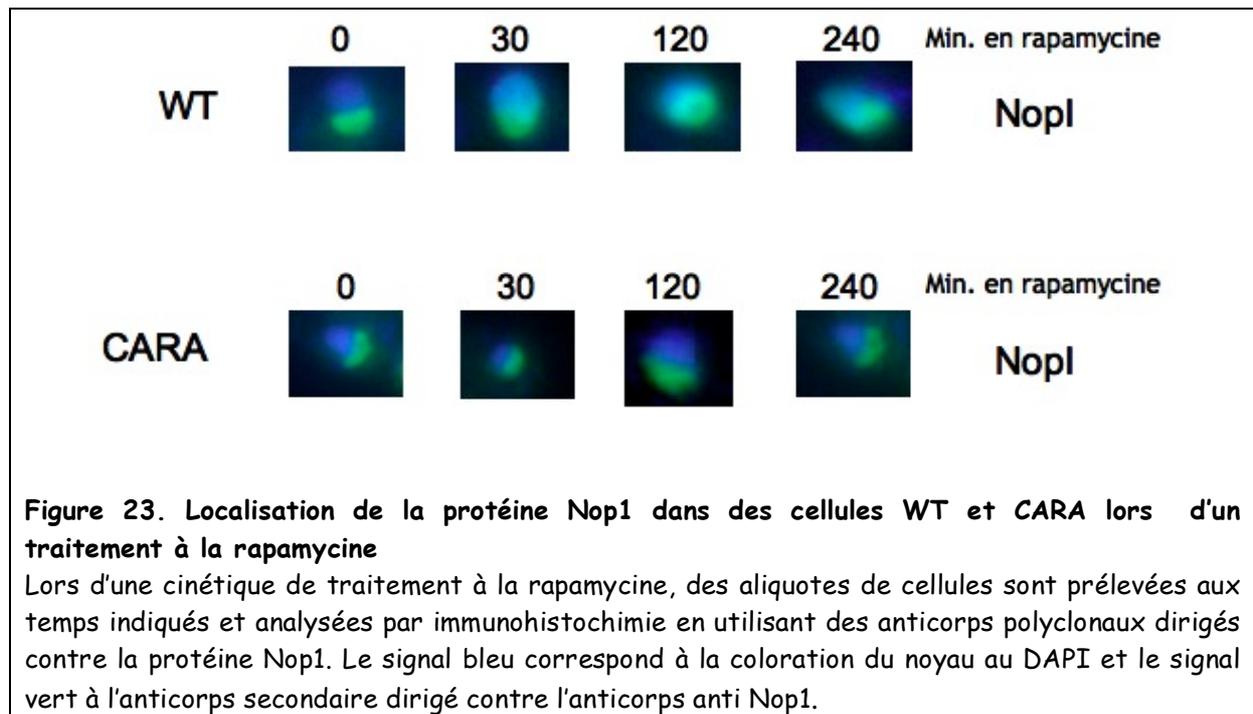


Figure 22. Localisation nucléaire de la Pol I dans des cellules WT et CARA lors d'un traitement à la rapamycine

Lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine, des aliquotes de cellules sont prélevés aux temps indiqués et analysés par immunohistochimie en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la sous-unité A190 de la Pol I. Le signal bleu correspond à la coloration du noyau au DAPI et le signal rouge à l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps anti A190. Au temps 0 ($DO_{600} = 1$) la rapamycine à une concentration de $0,5\mu\text{g/ml}$ est ajoutée dans le milieu de culture

Afin de déterminer si d'autres protéines nucléolaires présentaient une localisation sub-cellulaire différente dans les cellules Wt et CARA en présence de rapamycine, nous avons analysé la distribution de Nop 1 dans ces deux types de cellules en présence de cette drogue. Nop1, qui est l'homologue de la fibrillarine chez les mammifères, est un composant de la petite sous-unité du processome qui est requis pour la maturation de l'ARNr pre-18S (Dragon et al., 2002; Schimmang et al., 1989; Tollervey et al., 1991). En utilisant des anticorps dirigés contre la fibrillarine humaine qui reconnaissent la protéine Nop1 de levure (D. Hernandez-Verdun, communication personnelle), nous avons d'abord confirmé que la localisation de cette protéine était strictement nucléolaire dans les cellules WT et CARA en l'absence de rapamycine. Dès 30 minutes de traitement, la localisation de Nop1 est sensiblement modifiée dans les cellules WT. Bien que restant strictement nucléaire, la localisation de la protéine apparaît plus diffuse (et ceci pendant toute la durée de la cinétique. (Figure 23)

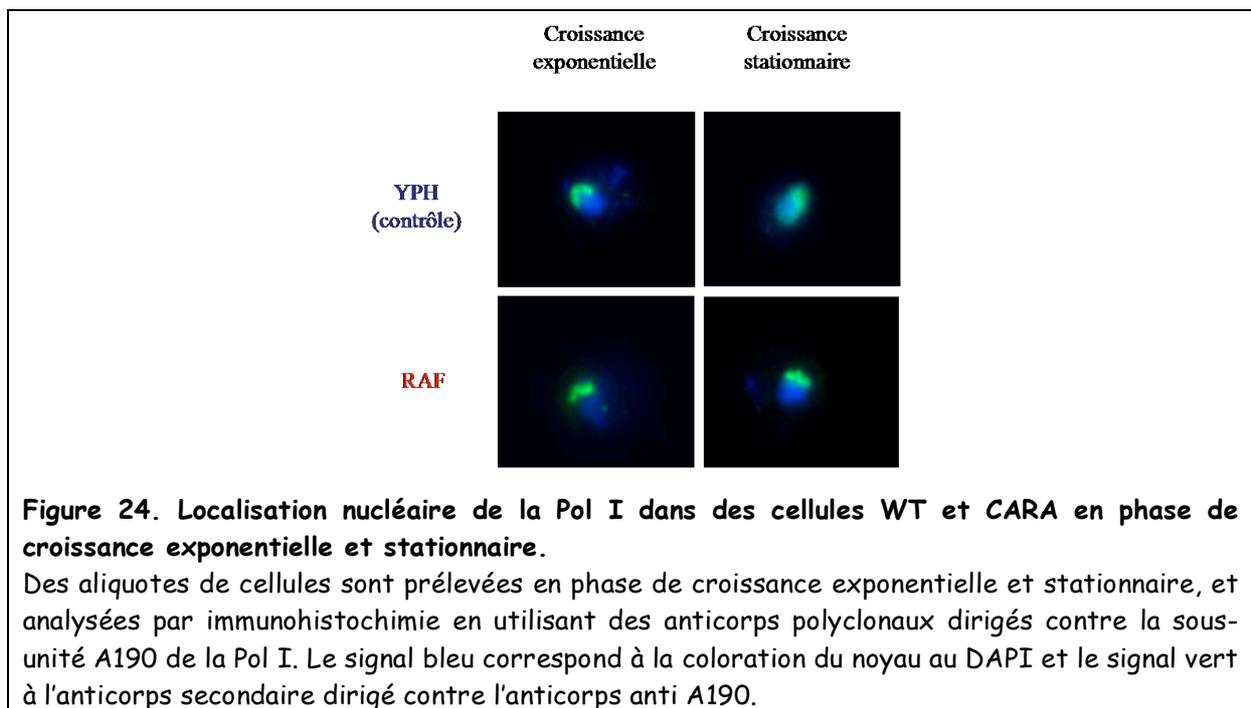


Dans les cellules CARA, nous n'avons pas observé de modification de localisation de la protéine Nop 1 en l'absence ou en présence de rapamycine (Figure 23).

Les données obtenues avec la Pol I et avec Nop1 sont donc tout à fait comparables et suggèrent qu'une modification profonde de la structure du nucléole est induite par la rapamycine dans les cellules Wt mais pas dans les cellules CARA. Pour pousser plus loin la réflexion, on peut en fait se demander si la structure du nucléole demeure inchangée dans les cellules CARA en présence de rapamycine. Des observations de microscopie électronique réalisées en collaboration avec l'équipe de Denis Lafontaine (ULB, Belgique) confirment les données de microscopie optique. En l'absence de rapamycine, la structure du nucléole est comparable dans les cellules CARA et Wt (données non montrées). Après 2h de traitement en présence de cette drogue, on observe une déstructuration importante du nucléole dans les cellules Wt mais pas dans les cellules CARA. Ces données sont cependant trop préliminaires pour déterminer si l'ultrastructure du nucléole n'est pas du tout modifiée dans les cellules CARA en présence de rapamycine ou si des modifications structurales surviennent qui ne modifient cependant pas drastiquement la structure globale de ce territoire nucléaire.

Ces résultats peuvent être mis en regard de données antérieures obtenues au laboratoire quant à la localisation de la Pol I en fonction du stade de croissance des

cellules. Comme nous l'avons déjà mentionné, cette enzyme présente dans des cellules Wt ou CARA en phase exponentielle de croissance une localisation en forme de croissant, typique du nucléole. Dans des cellules Wt en phase stationnaire, nous n'observons pas de relocalisation diffuse de la Pol I dans tout le noyau comme c'est le cas en présence de rapamycine, mais au contraire une espèce de condensation de la Pol I dans une structure déjà décrite mais non caractérisée et localisée à un pôle du noyau (Figure 24). Dans les cellules CARA en phase stationnaire, aucune modification apparente de la localisation de la Pol I n'est observée (Figure 24).



Enfin des données récentes obtenues par Lei Zhou, chercheur post-doctoral au laboratoire, indiquent qu'en présence de cadmium (qui conduit également à une répression de la transcription Pol I), la structure du nucléole n'apparaît pas modifiée dans les cellules CARA alors qu'elle est fortement bouleversée dans les cellules Wt (données non montrées).

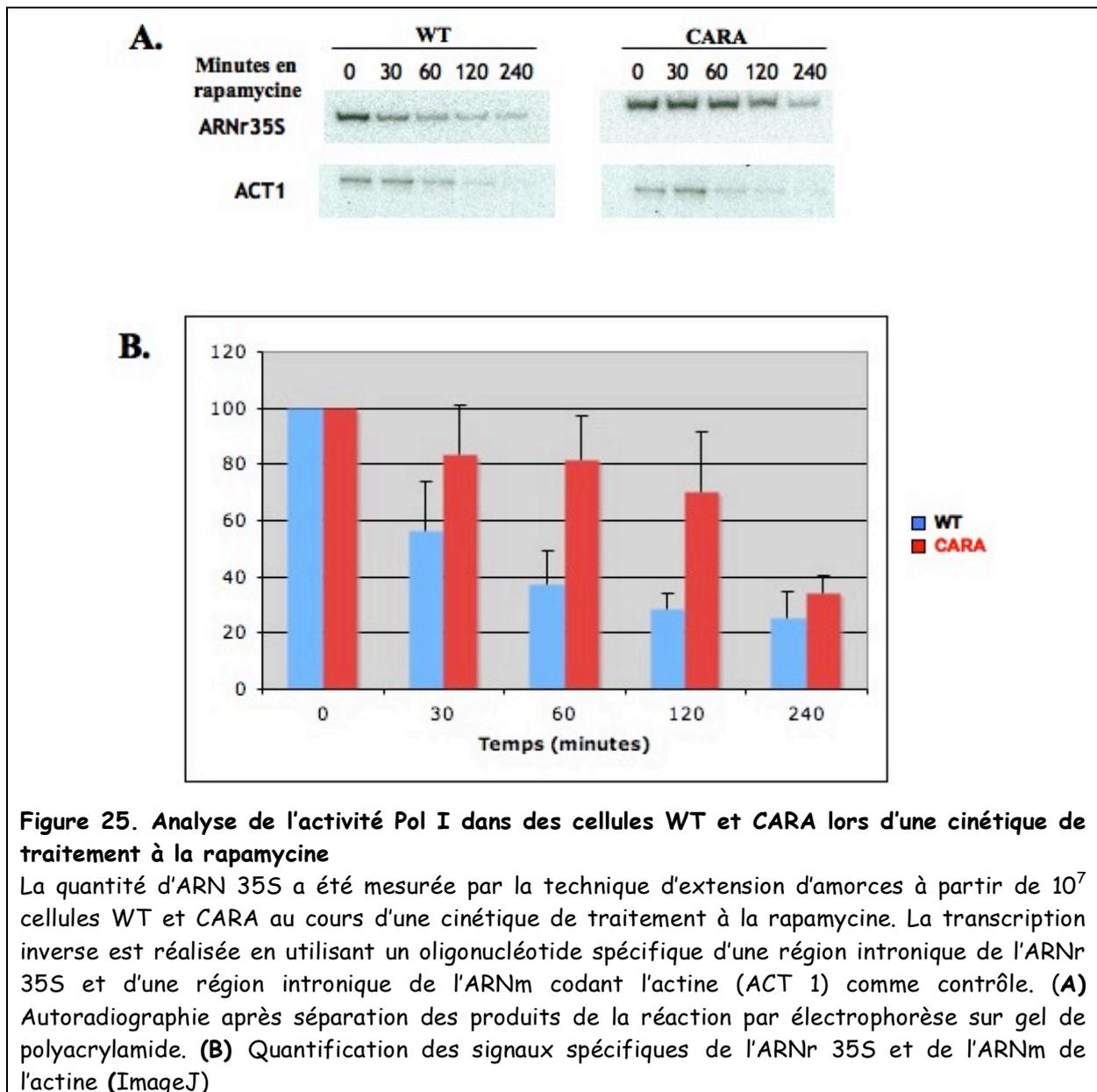
L'ensemble de ces observations suggère donc que dans différentes conditions conduisant à une répression de la transcription Pol I, on observe dans les cellules Wt mais pas dans les cellules CARA, une déstructuration massive du nucléole.

Comme indiqué dans l'introduction, le nucléole est un territoire nucléaire dynamique dont l'intégrité structurale nécessite une transcription Pol I active. Une explication triviale aux données décrites ci-dessus consisterait donc à imaginer que la dérégulation partielle de l'activité Pol I mise en évidence dans les cellules CARA permettrait de conserver un niveau d'activité de transcription de l'ADNr suffisant pour maintenir au sein du noyau une structure nucléolaire canonique.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu comparer l'évolution du niveau d'activité Pol I dans les souches Wt et CARA pendant un traitement long à la rapamycine.

I-2) Etude de l'activité Pol I dans les cellules Wt et CARA lors d'un traitement à la rapamycine

Une difficulté majeure dans ce type d'analyse est l'absence de technique permettant de mesurer de façon directe le niveau de transcription Pol I dans les cellules (cette remarque est d'ailleurs générale et s'applique à toutes les machineries transcriptionnelles cellulaires). Si l'abondance de l'ARNr 35S est assez facilement accessible, celle-ci ne reflète pas directement l'activité Pol I puisqu'elle représente un équilibre entre les niveaux de synthèse (transcription), de maturation et de dégradation des transcrits non maturés. Des données précédemment obtenues par A. Laferté et S. Chédin ont cependant montré que la maturation et la stabilité de l'ARNr 35S étaient équivalentes dans les cellules CARA et Wt pendant un traitement à la rapamycine (Laferte et al., 2006). Ainsi, nous considérerons que dans ces conditions, l'activité *in vivo* de la Pol I peut être estimée par la simple quantification du transcrit non maturé.



Cette quantification est réalisée par la technique d'extension d'amorces en utilisant des oligonucléotides s'hybridant dans la région 5' de l'ARN 35S qui est maturée la plus précocement (clivages A0 et A1). Pour les contrôles, nous avons utilisé des oligonucléotides s'hybridant dans la région intronique de l'ARNm codant l'actine. La réaction de transcription inverse est réalisée avec une amorce marquée radioactivement afin de pouvoir suivre le produit de la réaction par autoradiographie et de pouvoir le quantifier (Figure 25)

Dans les cellules Wt, nous observons une diminution importante du niveau d'ARNr 35S (jusqu'à 40%) dès 30 minutes de traitement et qui atteint 75 à 80% après 4 heures de traitement. Dans les cellules CARA, cette diminution est beaucoup moins importante

pour les premiers temps de la cinétique, en accord avec les données publiées antérieurement (Laferte et al., 2006). Après 4 heures de traitement cependant, le niveau résiduel d'ARNr 35S est comparable dans les deux souches. En ce qui concerne l'ARN contrôle (ARNm actine), nous observons une cinétique de répression rapamycine-dépendante qui est équivalente dans les cellules CARA et Wt pendant toute la durée du traitement.

Ces expériences confirment donc la dérpression partielle de l'activité transcriptionnelle Pol I dans les cellules CARA pour des temps courts de traitement à la rapamycine, mais indiquent que pour des temps longs de traitement, le même niveau de répression est observé dans les cellules CARA et Wt. Enfin, ces données montrent que la destructuration du nucléole constatée après 4 heures de traitement à la rapamycine dans les cellules Wt ne peut pas être simplement corrélée au niveau résiduel d'activité Pol I. **L'absence de remaniement apparent de la structure nucléolaire dans les cellules CARA pendant le traitement à la rapamycine suggère par ailleurs que le maintien de la structure nucléolaire et l'activité Pol I peuvent être découplés.**

Suite à ces observations, nous avons voulu déterminer pourquoi après quatre heures de traitement rapamycine la Pol I demeurait nucléolaire dans les cellules CARA. Chez *S. cerevisiae*, la répression rapamycine-dépendante de la transcription Pol I s'accompagne de la disparition de la Pol I du promoteur de l'ADNr 35S dans les cellules Wt (Claypool et al., 2004). Une hypothèse simple consiste donc à imaginer que la Pol I, bien qu'inactive ou faiblement active, est toujours localisée sur le promoteur de l'ADNr 35S dans les cellules CARA.

I-3) Etude de l'occupation de l'ADNr 35S par la Pol I dans les cellules CARA lors d'un traitement rapamycine

I-3-1) Analyse par immunoprécipitation de la chromatine

Nous avons étudié l'occupation de l'ADNr 35S dans les cellules WT et CARA durant une cinétique de traitement à la rapamycine par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Les cellules ont été récoltées aux différents temps de la cinétique, puis la chromatine a été extraite, soniquée et immunoprécipitée avec des anticorps polyclonaux

dirigés contre la sous-unité A190 de la Pol I. L'occupation de l'ADNr a été analysée grâce à des oligonucléotides s'hybridant au niveau du promoteur ainsi que sur différentes régions tout le long du 35S (Figure 26, A).

Pour les cellules WT (Figure 26), nous observons une diminution rapide de l'occupation du 35S par la Pol I dès les premiers temps de la cinétique conformément à ce qui est décrit dans la littérature (Claypool et al., 2004). Cette diminution est équivalente, quelle que soit la région de l'ADNr 35S étudiée (promoteur ou régions transcrites proximale, médiane ou distale) ce qui est en accord avec une répression rapamycine-dépendante de l'initiation de la transcription Pol I. Après 4 heures de traitement à la rapamycine, la diminution de la densité de molécules de Pol I atteint environ 80% qui correspond avec la baisse d'activité de synthèse de l'ARNr 35S observée par la technique d'extension d'amorces.

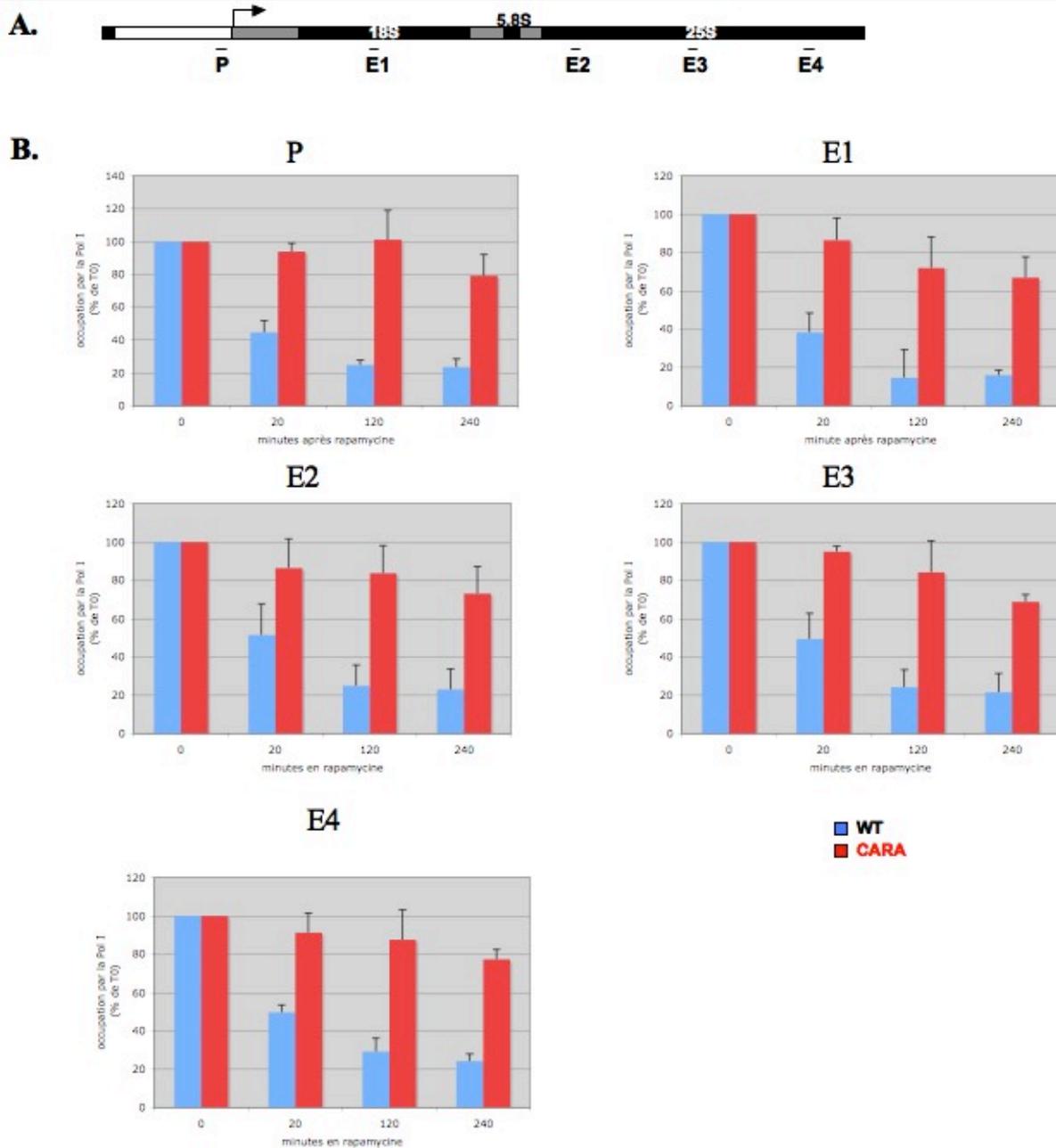


Figure 26. Occupation de l'ADNr 35S par la Pol I dans les souches WT et CARA lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine

L'occupation du gène de l'ADNr 35S par la Pol I est étudiée dans des cellules WT et CARA lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine. L'étape d'immunoprécipitation a été réalisée avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la sous-unité A190 de la Pol I. **(A)** Représentation schématique de la position sur l'ADNr 35S des couples d'amorces utilisées pour l'étape d'amplification par PCR en temps réel: P: promoteur, E1-E4 zones correspondant à la Pol I en élongation. **(B)** Quantification des signaux spécifiques détectés par PCR en temps réel pour les différents couples d'amorces.

Dans les cellules CARA (Figure 26), une situation totalement différente est observée. Après 30 min de traitement, nous constatons une légère diminution (environ 15 à 20%) du niveau d'occupation de l'ADNr par la Pol I qui semble ne plus évoluer au cours de la cinétique. Ainsi, après 4 heures de traitement, 70 à 75% du niveau initial d'enzyme sont encore associés à l'ADNr 35S, et ceci quelle que soit la zone du gène considérée (promoteur ou région transcrite, Figure 26). Ce résultat est surprenant car nos expériences d'extension d'amorces avaient montré que l'activité Pol I était fortement réprimée dans les cellules CARA après quatre heures de traitement. A priori, ce paradoxe pourrait avoir deux explications simples :

- soit les molécules de Pol I présentes sur l'ADNr des cellules CARA après 4h de traitement à la rapamycine sont transcriptionnellement inactives
- soit il reflète simplement la façon dont nos résultats sont représentés. Pendant la cinétique de traitement, ils sont en effet exprimés en pourcentage par rapport à l'occupation de l'ADNr 35S par la Pol I en l'absence de rapamycine ($t = 0$). On ne peut donc pas formellement exclure que le nombre absolu de complexes d'élongation de classe I soit sensiblement plus élevé dans les cellules Wt que dans les cellules CARA à $t = 0$, et qu'*in fine*, le niveau de Pol I encore associée à l'ADNr après 4h de traitement soit comparable dans les deux souches (notons qu'il faudrait quand même dans ce cas un niveau d'occupation 3 à 4 fois plus élevé dans les cellules Wt).

Afin de répondre à ce dernier point, nous avons exprimé nos résultats obtenus dans 6 expériences de ChIP indépendantes en les standardisant par rapport au signal obtenu pour les gènes *ADH1*, *RPL7* et *RPL9* transcrits par la Pol II car il n'est évidemment pas possible d'utiliser un autre gène transcrit par la Pol I). Ainsi, il est possible d'obtenir des données de ChIP quantitatives (ou tout au moins semi-quantitatives) qui montrent qu'en l'absence de rapamycine, la densité de Pol I sur l'ADNr dans les cellules CARA est environ une fois et demie plus faible que dans les cellules Wt (Figure 27)

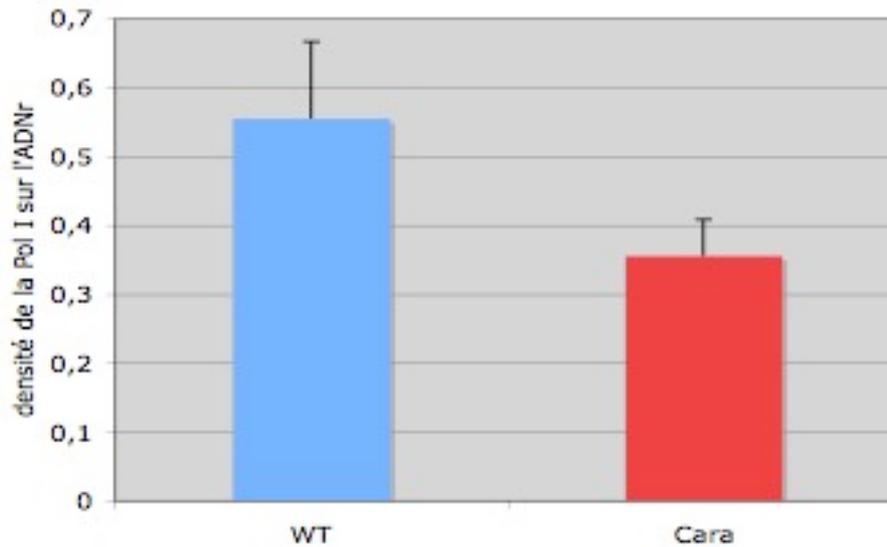


Figure 27. En phase exponentielle de croissance, la densité de Pol I sur l'ADNr 35S est plus importante dans les cellules WT que dans les cellules CARA

Quantification en valeur absolue de l'occupation de l'ADNr 35S par la technique d'immunoprécipitation de la Chromatine (à partir de 6 expériences indépendantes) en l'absence de rapamycine (dans des cellules en phase exponentielle de croissance)

En conclusion, nos données de ChIP indiquent :

- i) qu'en l'absence de rapamycine, il y a environ 1,5 fois plus de molécules de Pol I associées aux copies d'ADNr dans les cellules Wt que dans les cellules CARA
- ii) que pendant le traitement à la rapamycine, une diminution très importante du nombre de molécules de Pol I associées aux copies d'ADNr est observée dans les cellules Wt alors que dans les cellules CARA, ce nombre ne diminue que très faiblement
- iii) que pendant le traitement à la rapamycine des cellules CARA, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de molécules de Pol I associées aux copies d'ADNr et l'activité transcriptionnelle Pol I (contrairement à ce que l'on observe dans les cellules Wt)
- iv) qu'après 4h de traitement à la rapamycine, on trouve environ 2,5 fois plus de molécules de Pol I associées aux copies d'ADNr dans les cellules CARA que dans les cellules Wt

Suite à ces données de ChIP, il est tentant de spéculer que les observations d'immunocytofluorescence suggérant un maintien de la structure nucléolaire dans les cellules CARA tout au long du traitement à la rapamycine reflètent simplement l'interaction d'un nombre plus élevé de molécules de Pol I avec l'ADNr 35S dans ces cellules. Si l'on imagine que la majorité des molécules d'enzymes observées sur l'ADNr dans les cellules CARA en présence de rapamycine se trouve au sein de complexes ternaires bloqués en élongation (ou transcriptionnellement inactifs), **nos données suggèrent que ce n'est pas un niveau d'activité Pol I en tant que tel qui est nécessaire au maintien de l'intégrité de la structure nucléolaire mais simplement la présence de complexes de classe I (productifs ou non) sur les unités d'ADNr.**

Les données obtenues par ChIP doivent néanmoins être considérées avec prudence. Il est en effet possible que l'accessibilité de la Pol I aux anticorps anti-A190 utilisés dans cette technique soit différente dans les cellules Wt et CARA, du fait de l'association covalente du facteur Rrn3 à l'enzyme dans cette dernière souche. De possibles changements de conformation de l'enzyme pendant le traitement à la rapamycine et/ou l'étape du cycle transcriptionnel peuvent donc se traduire par des rendements d'immunoprécipitation variables selon que l'on est dans un contexte Wt ou CARA, rendant délicate une interprétation quantitative de nos données.

Afin de compléter nos résultats de ChIP, nous avons collaboré avec l'équipe d'Ann Beyer (Université de Virginie, Charlottesville, Etats-Unis) pour caractériser la transcription Pol I par la technique de Miller spread basée sur l'observation directe au microscope électronique des unités d'ADNr.

I-3-2) Analyse par Miller spread

L'analyse par Miller spread permet d'accéder à plusieurs paramètres importants tels que la densité d'enzyme sur l'ADNr, l'observation de la maturation cotranscriptionnelle des ARNr naissants ou l'estimation de la proportion de copies d'ADNr transcrites (Figure 28).

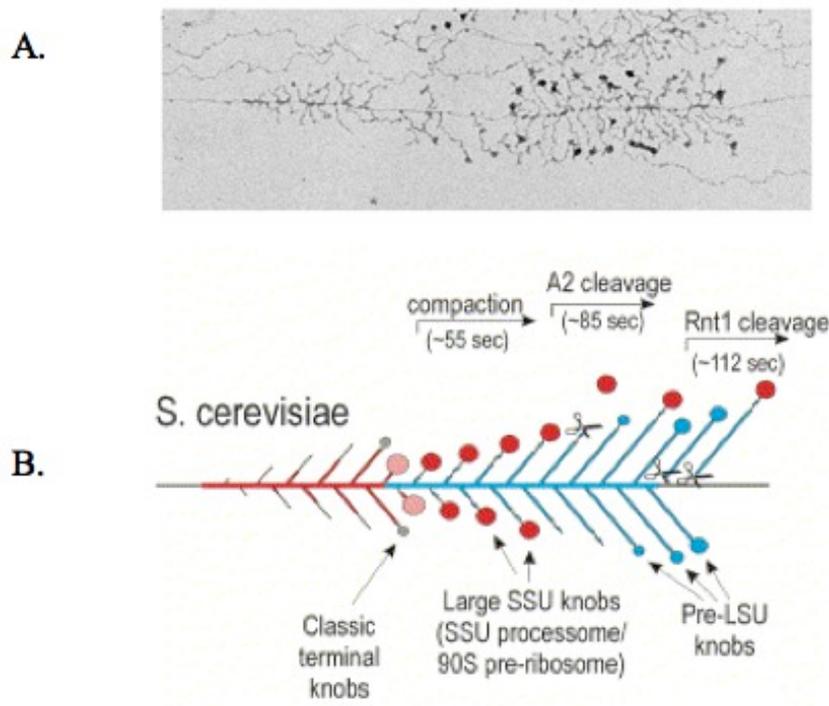
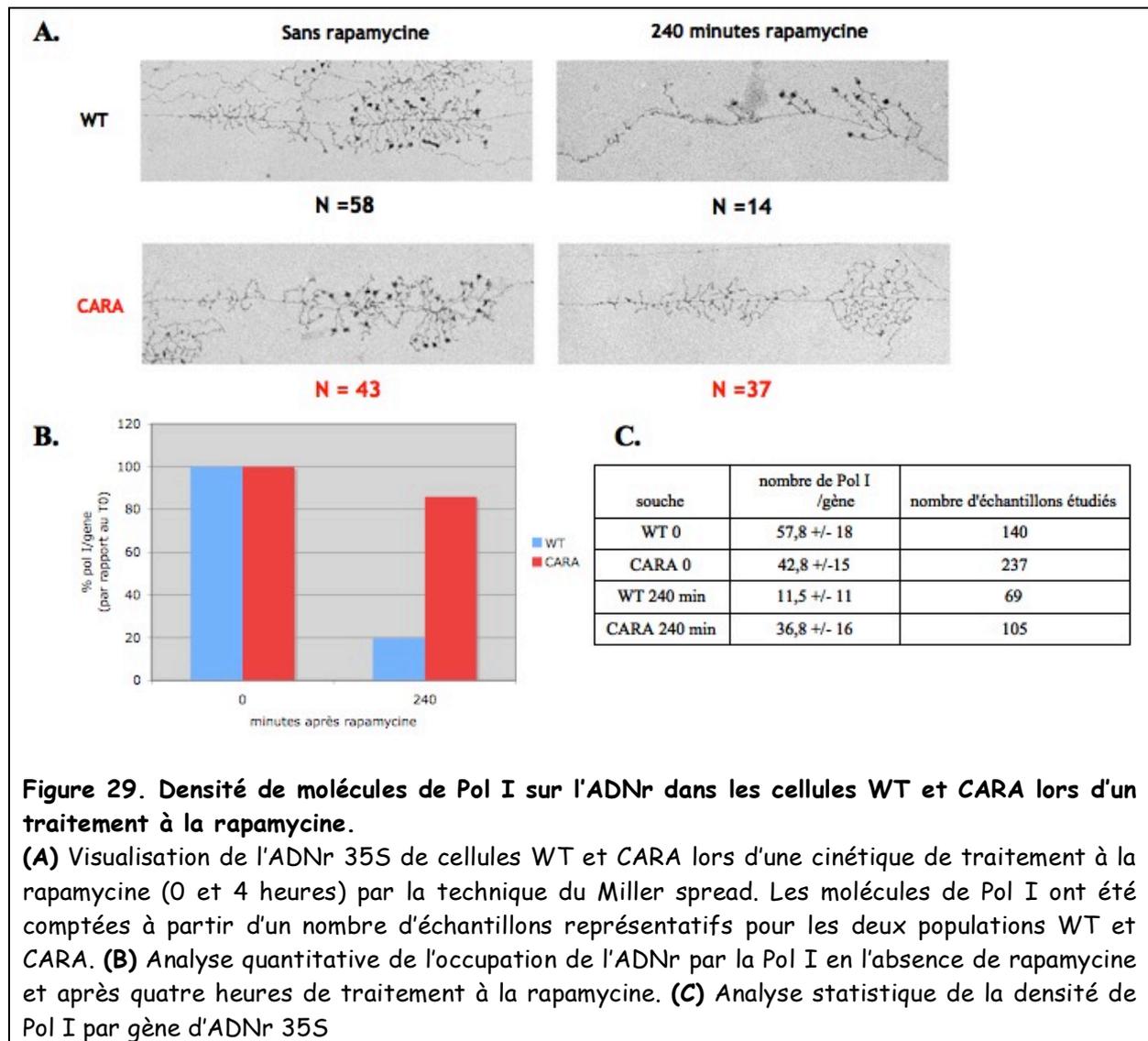


Figure 28. Structure en «arbre de Noël» de l'ADN ribosomique (A) Observation au microscope électronique d'une unité d'ADNr préparée par la méthode de Miller. L'ADNr 35S est transcrit par un grand nombre de molécules d'ARN polymérase I. Les boules situées aux extrémités des ARNr naissants correspondent à des complexes de maturation qui s'associent à l'ARN en cours de synthèse comme décrit dans le schéma ci-dessous. **(B)** Représentation schématique des évènements cotranscriptionnels observés par Miller spread. La taille des transcrits augmente jusqu'à ce que la Pol I atteigne la fin de la séquence du 18S (en rouge). L'ARNr 18S est ensuite compacté en une particule dense appelée SSU Knob (pour Small SubUnit). Ce SSU Knob n'est plus visible à partir du clivage au niveau du site A2. L'ARN 27SA2 naissant acquiert en 5' une nouvelle particule (LSU Knob pour Large SubUnit)). Le transcrit est enfin libéré par clivage cotranscriptionnel en 3' par la RNase Rnt1. D'après Osheim et al. 2004

Compte tenu de la lourdeur de cette approche, deux conditions seulement ont été analysées pour les cellules Wt et CARA : en l'absence de rapamycine (t=0) et après 4 heures de traitement.



Dans les cellules Wt, une diminution de la densité de Pol I sur l'ADNr d'environ 75% est observée après 4 heures de traitement à la rapamycine (de 58 molécules d'enzyme/unité d'ADNr à 14 molécules d'enzyme/unité d'ADNr, Figure 29, A), alors que dans les cellules CARA cette diminution est beaucoup plus modeste et de l'ordre de 15% (de 43 molécules d'enzyme/unité d'ADNr à 37 molécules d'enzyme/unité d'ADNr, Figure 29, A). Ces résultats corroborent donc les données obtenues par ChIP si l'on s'intéresse simplement au pourcentage de variation de densité de Pol I entre t = 0 et t = 4h de traitement à la rapamycine (Figure 30).

	Densité moyenne de Pol I sur l'ADNr 35 S (%T0)			
	ChIP		Miller spread	
	Wt	CARA	Wt	CARA
t = 0	100	100	100	100
t = 4h	21 ± 4	72 ± 5	20 ± 3	86 ± 4

Figure 30. Tableau représentatif de la densité moyenne de molécules de Pol I sur l'ADNr 35S obtenue par ChIP et par Miller spread.

Les analyses par Miller spread permettent également de déterminer de façon directe (et c'est là leur grande force) le nombre moyen de molécules de Pol I associées à chaque unité d'ADNr. En l'absence de rapamycine, on constate que ce nombre est plus élevé d'environ 30% dans les cellules Wt que dans les cellules CARA (58 versus 43), (Figure 29, A)

Pour pouvoir comparer nos données de ChIP et de Miller spread, il faut garder à l'esprit que ces deux techniques ne donnent pas exactement la même information : les données de ChIP sont globales et intègrent à la fois le nombre de copies d'ADNr transcrites et la densité moyenne sur chacune de ces copies, alors que le Miller spread permet seulement d'accéder à ce dernier paramètre. Cette remarque implique que nous devons prendre en compte le nombre absolu de copies d'ADNr ouvertes dans les cellules Wt et CARA pour interpréter plus complètement les données précédentes. L'obtention de ce paramètre est par ailleurs un point important pour essayer de déterminer les bases moléculaires responsables de la différence de densité de Pol I par copie d'ADNr 35S observée dans les cellules CARA et Wt en l'absence de rapamycine, question qui fait l'objet du paragraphe suivant.

I-4) Pourquoi, en l'absence de rapamycine, l'occupation moyenne par la Pol I des copies d'ADNr dans les cellules CARA est-elle plus faible que dans les cellules Wt ?

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, les données obtenues par ChIP et Miller spread montrent que la densité de molécules de Pol dans les cellules CARA était plus faible que dans les cellules Wt (Figure 27 et Figure 29, A). Quoique

différentes, les valeurs obtenues par Miller spread (43 et 58 molécules/copie d'ADNr pour les souches CARA et Wt) restent proches de celles classiquement trouvées dans différentes souches de levure Wt ayant des fonds génétiques différents (entre 46 et 56 molécules de Pol I / copie d'ADNr, Ann Beyer, communication personnelle).

Avant de poursuivre cette analyse, nous avons voulu déterminer dans un premier temps si de façon générale, la densité d'ARN polymérases sur les gènes des cellules CARA était plus faible que sur ceux des cellules Wt. Nous avons donc étudié l'occupation par la Pol II des gènes *ADH1* et *ACT1* en conditions normales de croissance, et ceci sur les mêmes chromatines que celles utilisées pour étudier l'occupation de la Pol I sur l'ADNr 35S.

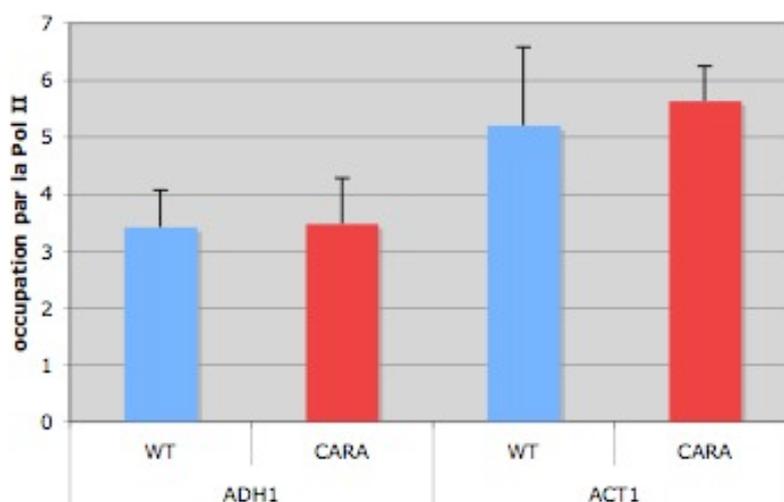


Figure 31. En phase exponentielle de croissance la densité de molécule de Pol II sur les promoteurs des gènes *ADH1* et *ACT1* est semblable dans les souches WT et CARA. L'occupation des promoteurs des gènes *ADH1* et *ACT1* est étudiée dans des cellules WT et CARA en phase exponentielle de croissance par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine. L'étape d'immunoprécipitation a été réalisée avec des anticorps dirigés contre le domaine CTD de la sous-unité Rpb1 de la Pol II. Les histogrammes représentent la quantification des signaux spécifiques détectés par PCR en temps réel pour les différents couples d'amorces.

Les résultats, obtenus au laboratoire par Vivienne Fardeau, montrent que le niveau d'occupation de ces 2 gènes par la Pol II est semblable dans les deux souches Wt et CARA dans des conditions normales de croissance (Figure 31). Des données antérieures,

obtenues sur différents gènes codant des protéines ribosomiques et sur l'ADNr 5S (transcrit par la Pol III) corroborent cette observation.

La différence de densité d'ARN polymérase sur les gènes des cellules Wt et CARA semble donc limitée à la Pol I et pourrait avoir différentes origines :

- a) une augmentation du nombre de copies actives d'ADNr dans la souche CARA qui conduirait à une densité moyenne plus faible de Pol I sur chaque copie d'ADNr 35S par simple répartition d'un même nombre limitant de Pol I compétentes pour l'initiation de la transcription.
- b) Une capacité différente dans les cellules WT et CARA à assembler un complexe d'initiation de la transcription
- c) des propriétés mécanistiques différentes des Pol I CARA et WT

Nous nous sommes d'abord intéressés à la première de ces hypothèses. Des résultats obtenus dans le laboratoire du Pr. Nomura ont montré qu'une souche de levure ne contenant que 40 copies d'ADNr ne présentait aucun défaut de croissance. Dans cette souche mutante, la totalité des copies d'ADNr est sous forme ouverte, chacune étant transcrite par environ 80 complexes d'élongation de classe I. Dans la souche isogénique Wt, qui contient environ 160 copies d'ADNr, ces chercheurs ont observé que 50% de ces copies étaient ouvertes et qu'on trouvait en moyenne 40 complexes de transcription par unité transcrite. Ainsi, le nombre total de molécules de Pol I transcrivant l'ADNr est équivalent dans ces deux souches. Puisque l'on a *a priori* 40 et 80 complexes de pré-initiation assemblés dans ces deux souches, ces données suggèrent qu'un nombre limitant de molécules d'enzyme compétentes pour l'initiation de la transcription se répartit de façon stochastique sur les copies d'ADNr accessibles (i.e. ouvertes). Il est également possible que la quantité de molécules de Pol I compétentes pour l'initiation de la transcription ne soit pas limitante *in vivo*, et qu'une régulation existe au niveau de la vitesse d'initiation de la transcription. Quoiqu'il en soit, ces données démontrent sans ambiguïté que le nombre de copies ouvertes au sein du locus *RDN1* influe directement sur la densité des complexes d'élongation de classe I par unité d'ADNr. Nous nous

sommes donc attachés dans un premier temps à estimer ce paramètre dans les cellules Wt et CARA.

I-4-1) Estimation du nombre de copies actives d'ADNr dans les cellules Wt et CARA

Une augmentation du nombre de copies actives d'ADNr dans une souche de levure peut avoir deux origines : une augmentation de la taille du locus *RDN1* et/ou une augmentation du ratio copies ouvertes versus copies fermées. Nous avons donc examiné ces deux paramètres dans les cellules Wt et CARA.

a) Caractérisation de la taille du locus *RDN1* dans les cellules Wt et CARA

Nous avons déterminé le nombre de copies d'ADNr présent dans les cellules Wt et CARA par la technique de Southern blot. L'ADN génomique extrait de cellules en phase exponentielle de croissance a été digéré par l'enzyme HindIII (qui clive entre chaque unité d'ADNr), et les différents fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel puis analysés par Southern blot avec deux sondes radioactives, l'une s'hybridant avec l'ADNr 35S et l'autre avec le gène *Act1*. Dans ces conditions, deux fragments d'ADN sont détectés : un fragment de 6,4Kb révélé par la sonde ADNr 35S et un fragment de 3,9Kb révélé par la sonde *Act1* (Figure 31, A).

Pour pouvoir relier l'intensité des signaux obtenus par cette technique à un nombre donné de copies d'ADNr, nous avons utilisé 3 souches de levure aimablement données par le Pr. Nomura (Université d'Irvine, USA) dont le nombre de copies d'ADNr est connu et fixe (le gène *FOB1* qui intervient dans la régulation de l'expansion et de la contraction du locus *RDN1* étant inactivé dans ces souches).

Ces souches ont un locus *RDN1* contenant respectivement 25, 40 et 190 copies d'ADNr et le rapport de l'intensité des bandes de 6,4Kb et de 3,9KB obtenu pour chacune des souches permet de tracer une courbe de calibration avec laquelle nous pourrions estimer le nombre de copies d'ADNr dans les souches Wt et CARA (Figure 31)

Sur 3 expériences indépendantes de Southern blot, nos résultats montrent que le locus *RDN1* dans les cellules CARA est environ 20% plus grand que dans les cellules Wt (157

copies en moyenne versus 128 copies). Il eut sans nul doute été préférable d'avoir une souche supplémentaire possédant un nombre de copies d'ADNr intermédiaire entre 40 et 190 afin de pouvoir tracer une courbe de calibration plus précise, mais une telle souche n'existe pas. Quoiqu'il en soit, nos résultats sont reproductibles et présentent malgré cette restriction un bon degré de confiance.

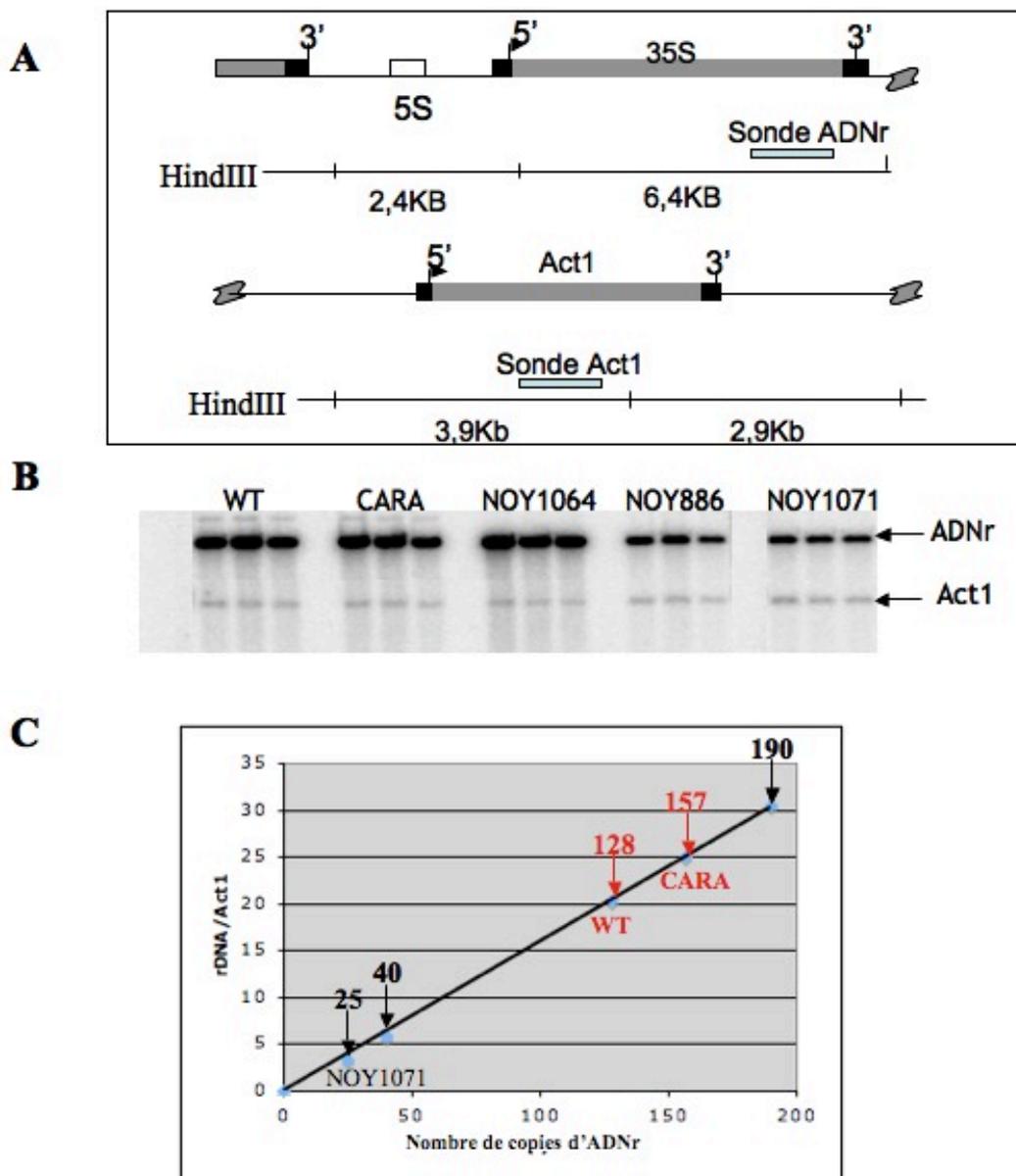


Figure 32. Détermination du nombre de copies d'ADNr dans des cellules WT et CARA

Les souches WT et CARA ainsi que les souches NOY1064, NOY886 et NOY1071 contenant respectivement 190, 40 et 25 copies d'ADNr sont cultivées en milieu YPD. L'ADN est ensuite extrait de cellules en phase exponentielle de croissance et après digestion avec l'enzyme HindIII un Southern Blot est réalisé avec les sondes ADNr et Act1. L'expérience est réalisée en triplicate (A) Cartographie d'une répétition d'ADNr et du gène Act1. Les gènes codants les ARNr 35S et 5S sont représentés par des rectangles gris et blanc respectivement. Les sondes d'hybridation utilisées lors de cette expérience ainsi que les sites de coupure par HindIII sont indiquées. (B) Autoradiographie obtenue après Southern blot avec les sondes ADNr et Act1. La position des bandes correspondant aux signaux de l'ADNr et du gène Act1 est indiquée par des flèches. (C) Représentation graphique du nombre de copies d'ADNr en fonction du rapport des signaux ADNr/ACT1. Les signaux ont été quantifiés par le logiciel ImageJ après autoradiographie des membranes (Typhon, GE Healthcare).

b) Détermination du ratio copies d'ADNr ouvertes/fermées dans les cellules Wt et CARA

Ainsi que je l'ai mentionné dans l'Introduction de ce manuscrit, toutes les copies d'ADNr présentes dans une cellule ne sont pas accessibles à la machinerie de transcription Pol I. Elles peuvent en effet être dépourvues de nucléosomes (ouvertes) et donc accessibles à la machinerie de transcription Pol I, ou recouvertes de nucléosomes (fermées) et donc inactives. Une certaine ambiguïté règne dans la littérature entre les notions de copies ouvertes et de copies transcrites. Il est clair que pour être transcrite, une copie d'ADNr doit être ouverte, mais il n'est pas certain que dans des conditions physiologiques, toute copie ouverte est transcrite. C'est pourtant l'approximation que nous ferons.

Les proportions relatives de copies ouvertes et fermées varient dans les cellules de levure en réponse aux conditions de milieu et de croissance cellulaire. Dans un milieu riche, en phase exponentielle de croissance, le pourcentage de gènes actifs est d'environ 50% (Dammann et al., 1993). Notons au passage que cette observation, confirmée par de nombreux laboratoires, reste assez énigmatique : pourquoi en effet dans des conditions de croissance considérées comme optimales (et correspondant au temps de génération le plus court déterminé pour des cellules de levure) seule la moitié des copies d'ADNr pourrait-elle être transcrite ?

Le pourcentage de copies ouvertes d'ADNr peut être déterminé par des expériences de pontage de la chromatine au psoralène. Le psoralène est un agent chimique intercalant qui peut pénétrer dans les cellules et se lier de façon covalente à l'ADN après irradiation aux ultraviolets. La fixation du psoralène sur l'ADN se produit préférentiellement sur les régions transcrites et donc dépourvues de nucléosomes (Conconi et al., 1989). Le profil de migration électrophorétique des fragments d'ADNr permet de distinguer les copies pontées au psoralène (donc ouvertes) des copies fermées car la liaison à cet agent intercalant ralentit la migration lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Nous avons réalisé ces expériences de photopontage au psoralène dans des cellules Wt et CARA en phase exponentielle de croissance. Les conditions expérimentales sont très

déliçates à mettre au point et je suis allée à Regensburg (Allemagne) dans le laboratoire du Pr H. Tschochner pour réaliser ces expériences avec l'aide du Dr. J. Griesenbeck.

Les noyaux des cellules ont été incubés en présence de psoralène et irradiés aux ultraviolets. Après extraction puis digestion de l'ADN génomique avec EcoRI, un Southern blot a été réalisé avec une sonde radioactive spécifique de l'ADNr 35S qui s'hybride dans nos conditions avec un fragment d'ADNr de 1,9kb. Selon que la copie d'ADNr correspondant à ce fragment était ouverte ou fermée, ce dernier sera lié ou non lié au psoralène (Figure 32). Pour chacune des souches, deux bandes peuvent donc être observées : la bande de migration rapide (f-band) correspond aux molécules d'ADN fermées et la bande de migration ralentie (s-band) correspond aux molécules ouvertes accessibles au psoralène.

Nos résultats expérimentaux ne sont pas optimaux. En effet, une résolution médiocre entre les « bandes f » et « s » a été observée, en particulier pour les fragments d'ADN issus des cellules CARA (Figure 32, B). Ce problème de résolution n'est pas lié à la préparation de nos échantillons puisque des expériences réalisées avec d'autres échantillons préalablement obtenus en Allemagne présentent le même défaut (données non montrées). Après quelques tentatives infructueuses en vue de résoudre ce problème technique, nous avons quand même analysé les gels obtenus.

En l'absence de rapamycine, nous avons observé que dans les cellules CARA la proportion de « bande s » était plus faible que dans les cellules Wt, ce qui indique que la proportion de copies fermées est plus importante dans les cellules CARA que dans les cellules Wt (Figure 33). Notons que des observations identiques ont déjà été faites par H. Tschochner quand il a analysé d'autres souches mutantes de levure présentant une densité faible de Pol I sur les copies d'ADNr.

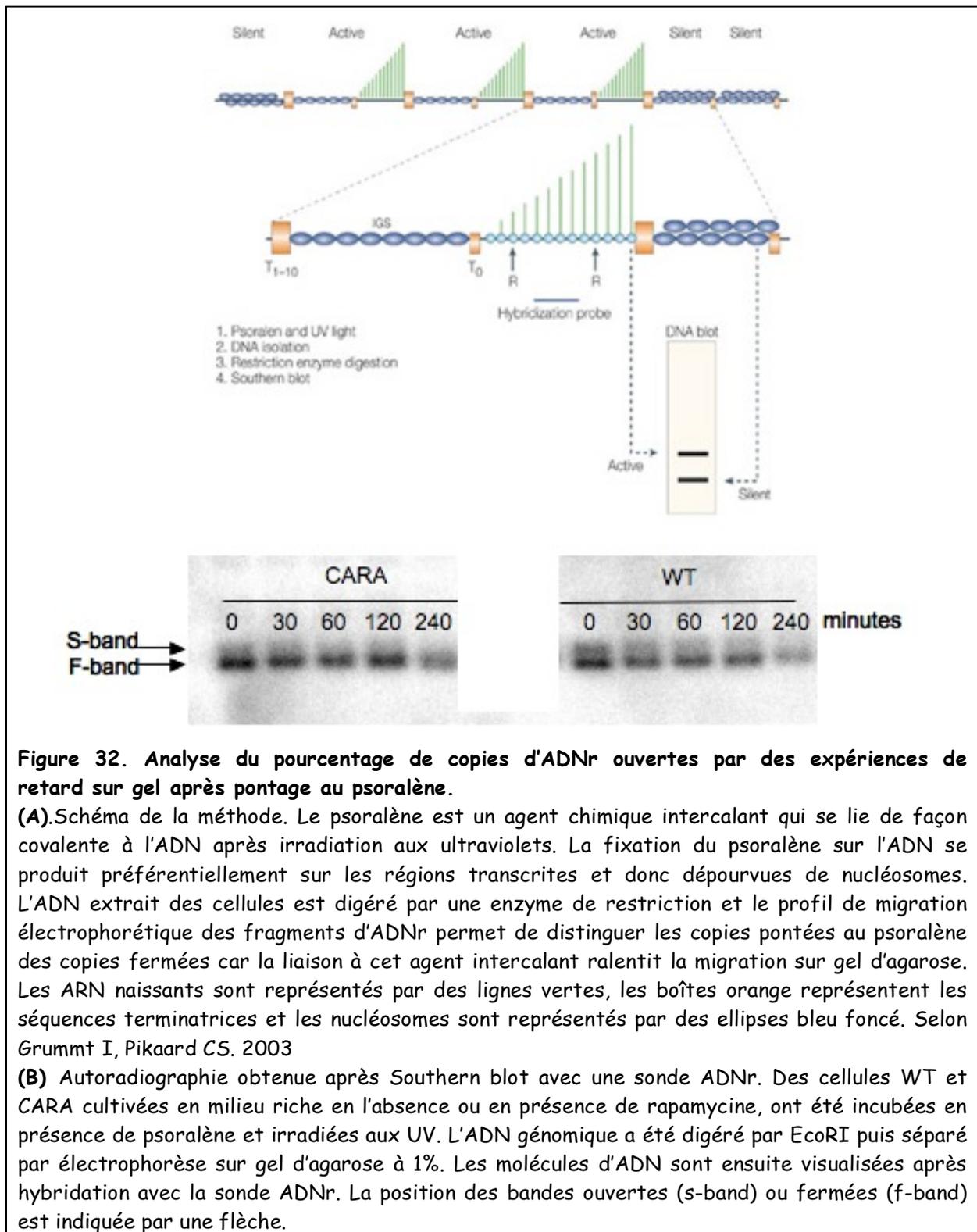


Figure 32. Analyse du pourcentage de copies d'ADNr ouvertes par des expériences de retard sur gel après pontage au psoralène.

(A) Schéma de la méthode. Le psoralène est un agent chimique intercalant qui se lie de façon covalente à l'ADN après irradiation aux ultraviolets. La fixation du psoralène sur l'ADN se produit préférentiellement sur les régions transcrites et donc dépourvues de nucléosomes. L'ADN extrait des cellules est digéré par une enzyme de restriction et le profil de migration électrophorétique des fragments d'ADNr permet de distinguer les copies pontées au psoralène des copies fermées car la liaison à cet agent intercalant ralentit la migration sur gel d'agarose. Les ARN naissants sont représentés par des lignes vertes, les boîtes orange représentent les séquences terminatrices et les nucléosomes sont représentés par des ellipses bleu foncé. Selon Grummt I, Pikaard CS. 2003

(B) Autoradiographie obtenue après Southern blot avec une sonde ADNr. Des cellules WT et CARA cultivées en milieu riche en l'absence ou en présence de rapamycine, ont été incubées en présence de psoralène et irradiées aux UV. L'ADN génomique a été digéré par EcoRI puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les molécules d'ADN sont ensuite visualisées après hybridation avec la sonde ADNr. La position des bandes ouvertes (s-band) ou fermées (f-band) est indiquée par une flèche.

L'analyse quantitative de ces données est évidemment plus délicate à réaliser, mais quelle que soit la façon dont les surfaces des différents pics sont calculées, on trouve une diminution du pourcentage de copies ouvertes dans les cellules CARA (par rapport au Wt) toujours comprise entre 25 et 50%. Si l'on considère que le locus *RDN1* est environ

30% plus grand dans les cellules *CARA* que dans les cellules *Wt*, on peut en conclure que le nombre de copies d'ADNr 35S ouvertes dans les cellules *CARA* est soit équivalent à celui présent dans les cellules *Wt*, soit légèrement plus faible (jusqu'à environ 30%).

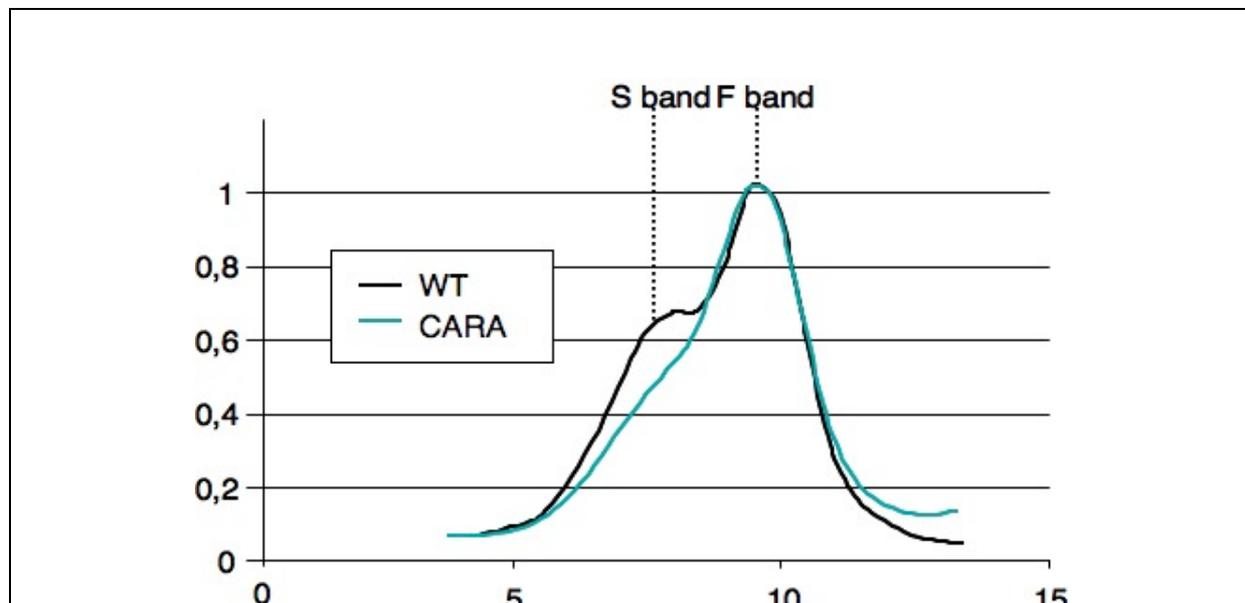


Figure 33. Comparaison du pourcentage de copies d'ADNr ouvertes et fermées dans les cellules WT et CARA en l'absence de rapamycine

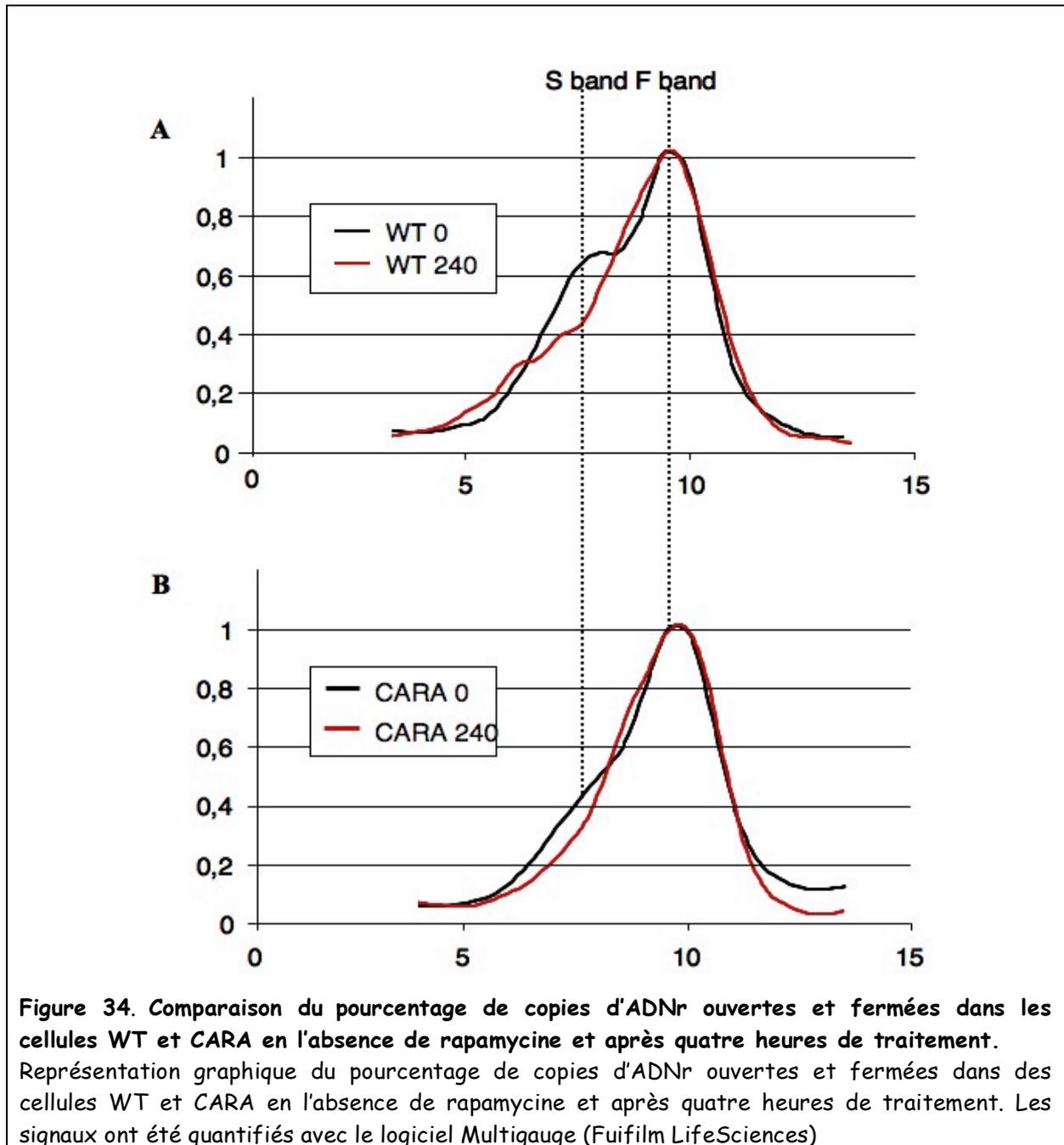
Représentation graphique du pourcentage de copies d'ADNr ouvertes et fermées dans des cellules WT et CARA en l'absence de rapamycine. Les signaux ont été quantifiés avec le logiciel Multigaue (Fuifilm LifeSciences)

Il est également possible d'estimer la proportion de copies d'ADNr transcrites par Miller spread. Dans cette méthode, tous les fragments d'ADNr assez longs pour contenir au moins trois unités contiguës d'ADNr ont été analysés. En l'absence de rapamycine, ($t = 0$ de la cinétique), des proportions similaires de copies d'ADNr 35S transcrites ont été obtenues pour les cellules *Wt* et *CARA* (81% et 80% respectivement). Il faut noter que cette technique a tendance à surestimer le pourcentage de gènes transcrits (Ann Beyer, communication personnelle), peut être à cause du fait que ces copies sont plus facilement détectables par cette méthode que les copies non transcrites. La comparaison entre deux souches de levure reste cependant pertinente et cette observation permet de compléter les résultats que nous avons obtenus après pontage au psoralène.

En conclusion, les données de pontage au psoralène obtenues en l'absence de rapamycine indiquent qu'il ne peut pas y avoir plus de copies ouvertes dans les cellules CARA que dans les cellules Wt. Ces observations ne sont pas antinomiques avec les données de Miller spread qui suggèrent que le nombre de copies d'ADNr 35S transcrites dans les cellules CARA et dans les cellules Wt est comparable. Même s'il est difficile d'aller plus loin d'un point de vue quantitatif, ces résultats sont importants car ils démontrent que la densité plus faible de Pol I sur l'ADNr observée dans les cellules CARA ne résulte pas d'une simple redistribution des molécules d'enzyme sur un nombre plus important de gènes d'ADNr 35S accessibles.

Remarque 1

Nous avons également analysé par photopontage au psoralène l'évolution du pourcentage de copies d'ADNr ouvertes dans les cellules Wt et CARA pendant un traitement à la rapamycine. Dans les cellules Wt, la proportion de « bande s » diminue au fur et à mesure du traitement (Figure 34, A) alors que dans les cellules CARA, aucun changement significatif des proportions des bandes s et f (lentes et rapides) n'est mis en évidence (Figure 34, B) Ces observations, ainsi que les données de ChIP et de Miller spread décrites précédemment confirment que la transcription Pol I dans les cellules CARA répond de façon tout à fait anormale à la rapamycine : même si un fort niveau de répression (comparable à celui observé dans les cellules Wt) est observé pour des temps de traitement longs, la fraction de copies d'ADNr ouvertes et le nombre de molécules présentes sur ces copies n'évoluent que très faiblement en présence de cette drogue.



Remarque 2

Les cellules CARA étant moins sensibles au traitement rapamycine, ces cellules montrent une légère diminution de la proportion de copies actives et de l'occupation de l'ADNr par la Pol I. Par contre, dans les cellules WT, La diminution de ces deux paramètres est beaucoup plus importante. Des études ont déjà montré que l'inhibition de la voie TOR (par un traitement de 30 minutes à la rapamycine) avait pour cible le

complexe Pol I-Rrn3, conduisant à la réduction du nombre de molécules de polymérase par gène mais pas à la réduction de la proportion de copies actives (Claypool et al., 2004). La diminution de la proportion de copies actives observée dans les cellules WT ne va pas à l'encontre de cette observation car après 4 heures de traitement rapamycine, la densité de molécules de Pol I diminue grandement conduisant à l'observation d'un très petit nombre de gènes d'ADNr 35S avec des polymérases engagées en élongation.

La première hypothèse que nous avons formulée pour expliquer la densité moindre de Pol I sur les copies d'ADNr n'étant pas vérifiée, nous avons décidé d'étudier le recrutement du complexe d'initiation de classe I sur l'ADNr 35S dans les cellules Wt et CARA.

I-4-2) Analyse du recrutement des composants du complexe de pré-initiation de classe I dans les cellules Wt et CARA

Nous avons vu dans l'Introduction que lors d'un cycle de transcription, la Pol I est recrutée sur le promoteur de l'ADNr 35S par le complexe de pré-initiation (PIC). Ce complexe, formé des facteurs de transcription CF, UAF et TBP (Figure 3, introduction), est stabilisé sur le promoteur bipartite de l'ADNr via des interactions avec l'ADN, et entre les différents partenaires protéiques qui le composent. Un défaut fonctionnel de ce complexe dans les cellules CARA pourrait expliquer une densité de polymérase I plus faible dans ces cellules par rapport aux cellules Wt, par exemple en recrutant moins efficacement la Pol I, ou en affectant l'étape d'échappement du promoteur.

Ne disposant malheureusement pas de techniques permettant d'analyser le recrutement de la Pol I par le PIC, ni de disséquer les étapes élémentaires du cycle transcriptionnel *in vivo*, nous avons simplement réalisé des expériences de ChIP sur le CF et sur UAF dans des cellules Wt et CARA lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine ou en l'absence de cette drogue, afin de voir un éventuel défaut d'assemblage du PIC sur le promoteur de l'ADNr. N'ayant pas à notre disposition d'anticorps dirigés contre des

sous-unités de ces deux complexes, nous avons étiqueté dans les deux souches la sous-unité Rrn7 du CF et la sous-unité Rrn9 de UAF par une étiquette HA afin de pouvoir utiliser les anticorps 12CA5 dirigés contre cet épitope.

En l'absence de rapamycine, et dans des cellules Wt ou CARA en phase exponentielle de croissance, nous observons que l'occupation du promoteur de l'ADNr 35S par UAF est trois fois plus importante dans les cellules Wt que dans les cellules CARA. Ce résultat doit être considéré avec prudence car nous avons obtenu un niveau de signal IP/input très faible pour cette expérience de ChIP. Ce niveau très bas témoigne vraisemblablement de la faible abondance du complexe UAF dans les cellules (moins de 300 molécules par cellule) et/ou d'une interaction non directe entre Rrn9 et l'ADN. Il devra donc être confirmé par plusieurs expériences de ChIP indépendantes.

Les données obtenues avec CF sont légèrement plus robustes et indiquent que l'occupation du promoteur de l'ADNr 35S par le CF est une fois et demi plus importante dans les cellules Wt que dans les cellules CARA. Là encore, des expériences supplémentaires sont requises pour confirmer ce résultat.

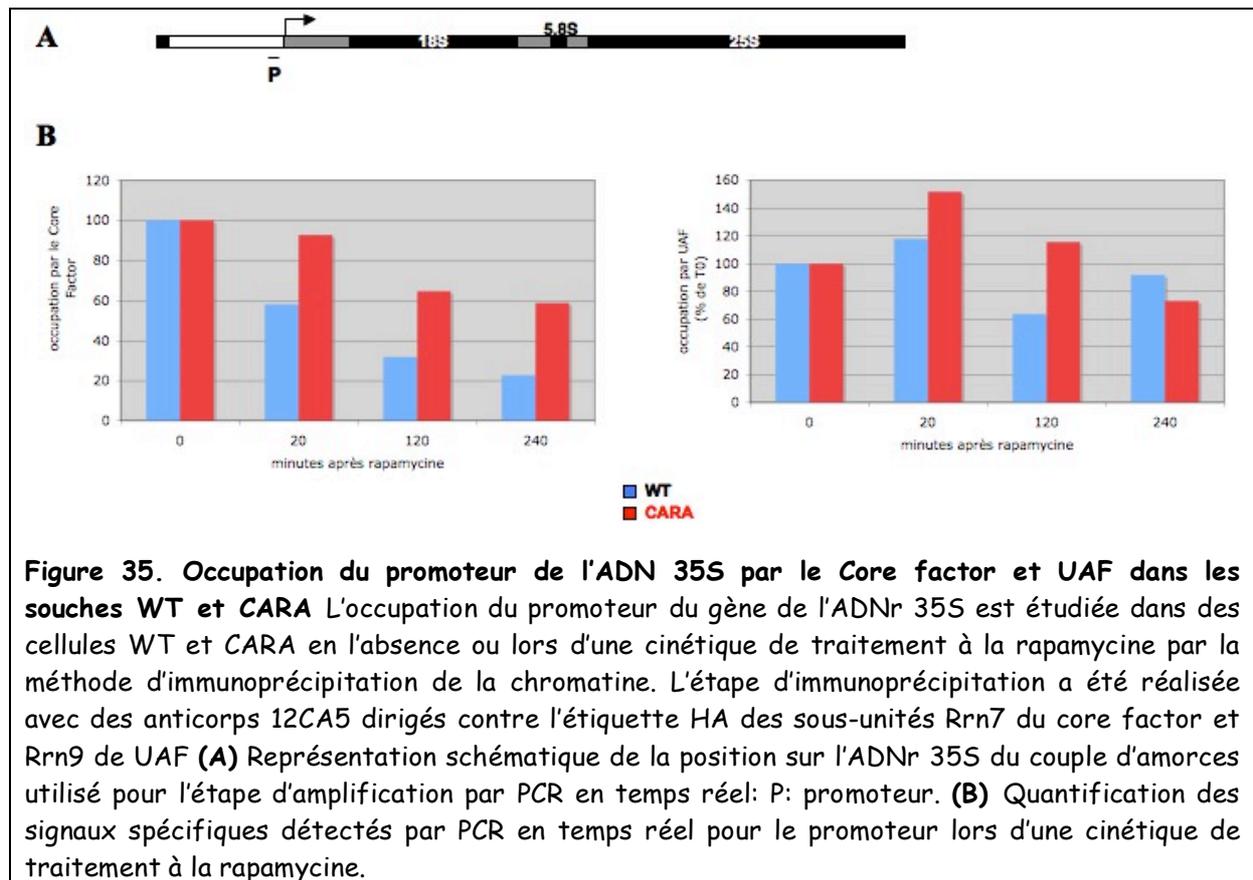
Une possible diminution du recrutement du CF et de UAF sur le promoteur de l'ADNr 35S dans les cellules CARA pourrait-elle être à l'origine de la différence d'occupation du locus *RDN1* par la Pol I observée entre les souches Wt et CARA ? Oui, si l'on considère les données de façon globale (i.e. les résultats de ChIP) et non si l'on prend en compte l'analyse individuelle obtenue pour chaque copie d'ADNr transcrite (i.e. les données de Miller spread). En effet, si l'on considère individuellement chaque copie d'ADNr, il n'y a qu'une alternative : soit un PIC est assemblé sur le promoteur, soit il ne l'est pas. Les copies transcrites ayant obligatoirement un PIC, seules des variations de l'efficacité du recrutement de la Pol I et/ou des vitesses d'échappement du promoteur différentes pourraient expliquer les différences de densité d'enzyme par unité d'ADNr observées dans les cellules Wt et CARA.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'effet de la rapamycine sur les cellules Wt et CARA, nous constatons que l'occupation du promoteur de l'ADNr 35S par le facteur UAF ne varie pas significativement pendant le traitement (Figure 35). Ce résultat est en accord avec les données publiées par l'équipe de Nomura et obtenues après une heure de traitement à la rapamycine (Claypool et al., 2004). On peut d'ailleurs noter qu'il n'existe

aucune donnée publiée suggérant qu'une régulation de l'initiation de la transcription Pol I puisse être médiée par le complexe UAF.

Parallèlement, une diminution sensible de l'occupation du promoteur de l'ADNr par le CF est observée dans les cellules WT en présence de rapamycine (jusqu'à 80% de diminution après 4 heures de traitement). Cette diminution est parfaitement comparable (tant quantitativement que d'un point de vue cinétique) à la diminution de l'occupation du promoteur de l'ADNr 35S par la Pol I (Figure 35). Ce résultat est attendu puisque l'ensemble des données obtenues quant au recrutement de la Pol I sur l'ADNr converge vers l'idée que la présence du CF sur le promoteur est requise pour recruter l'enzyme, mais qu'en l'absence de Pol I, ce facteur n'interagit pas de façon stable avec l'ADN.

En ce qui concerne les cellules *CARA*, nous observons là encore une diminution de la densité de CF au fur et à mesure du traitement, mais cette diminution est beaucoup moins importante que dans les cellules Wt (jusqu'à 40% de diminution après 4 heures de traitement). Le parallélisme avec la variation d'occupation du promoteur de l'ADNr 35S par la Pol I est donc conservé dans cette souche.



Conclusions :

Nous avons tenté d'expliquer pourquoi en l'absence de rapamycine, l'occupation moyenne par la Pol I des copies d'ADNr dans les cellules CARA est plus faible que dans les cellules Wt.

Nous avons d'abord estimé le nombre de copies actives d'ADNr dans les cellules Wt et CARA. Les données obtenues indiquent qu'il ne peut pas y avoir plus de copies ouvertes dans les cellules CARA que dans les cellules Wt. Donc la densité plus faible de molécules de Pol I sur l'ADNr observée dans les cellules CARA ne résulte pas d'une simple redistribution des molécules d'enzyme sur un nombre plus important de gènes d'ADNr 35S accessibles.

Ensuite nous avons testé notre deuxième hypothèse portant sur le recrutement du complexe d'initiation dans les cellules WT et CARA. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'étude du recrutement des composants du PIC ne peut pas expliquer les observations faites dans les cellules WT et CARA en l'absence de rapamycine, seules des variations de l'efficacité du recrutement de la Pol I et/ou des vitesses d'échappement du

promoteur différentes pourraient expliquer les différences de densité d'enzyme par unité d'ADNr observées dans les cellules Wt et CARA.

Finalement, nous avons voulu étudier les propriétés mécanistiques des Pol I WT et CARA en espérant que celles-ci pourraient nous éclairer sur la différence d'occupation moyenne par la Pol I des copies d'ADNr observée en absence de rapamycine entre les deux souches. Cette étude fait l'objet la partie suivante.

II) Analyse mécanistique de la transcription Pol I

II-1) Généralités et problématique

Ainsi que nous l'avons indiqué dans l'Introduction, un cycle transcriptionnel peut être décomposé schématiquement en 3 étapes majeures :

1) L'initiation de la transcription au cours de laquelle l'ARN polymérase est recrutée sur le promoteur d'un gène pour former avec les facteurs généraux qui lui sont associés le complexe d'initiation de la transcription.

2) L'élongation de la transcription au cours de laquelle le transcrit est synthétisé de manière processive (mais non monotone).

Remarque : entre les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription existe une étape complexe et finalement assez mal définie, appelée échappement du promoteur (ou « promoter escape »). Elle regroupe un ensemble d'évènements moléculaires incluant la rupture des interactions de l'ARN polymérase avec les facteurs de transcription généraux qui restent liés au promoteur et la synthèse des premières liaisons phosphodiester avant la première translocation du site actif. Cette étape est probablement déterminante quant au devenir immédiat de l'ARN polymérase (équilibre entre initiation abortive et entrée en élongation processive).

3) La terminaison de la transcription induisant la pause du complexe ternaire ARN polymérase-ARN-ADN sur le terminateur puis sa dissociation.

D'un point de vue théorique, et selon l'étape cinétiquement limitante du cycle transcriptionnel, des vitesses différentes de recrutement de la Pol I, d'échappement du promoteur et/ou d'élongation processive entre les cellules Wt et CARA pourraient conduire à des densités d'enzyme non identiques sur l'ADNr. Il est par ailleurs

vraisemblable que l'étape limitante (cinétiquement parlant) du cycle transcriptionnel puisse être différente dans les cellules Wt et CARA. Plusieurs données suggèrent en effet que dans des conditions standard de croissance, le niveau de complexe Pol I- Rrn3 est limitant pour la transcription Pol I dans les cellules Wt (Milkereit and Tschochner, 1998). Dans les cellules CARA, toutes les molécules de Pol I sont associées de façon covalente au facteur Rrn3 et forment un complexe Pol I- Rrn3 constitutivement actif et extrêmement abondant dans la cellule. Une analyse mécanistique complète nécessiterait donc la détermination des vitesses apparentes de toutes les étapes du cycle transcriptionnel pour les Pol I Wt et CARA, ce qui est techniquement impossible.

Dans la suite de cette partie, nous nous sommes concentrés sur la détermination *in vitro* de la vitesse d'élongation des Pol I Wt et CARA, et ce pour répondre à un double objectif :

- i) d'une part, cette étude devrait permettre d'obtenir des informations intéressantes quant aux conséquences de la non dissociation du complexe Pol I- Rrn3 sur l'élongation de la transcription (rappelons à ce propos que dans des conditions physiologiques, ce complexe se dissocie au moment ou peu après l'entrée en élongation processive).
- ii) d'autre part, elle permettra de préciser si des vitesses d'élongation différentes des Pol I Wt et CARA peuvent participer à la différence de densité d'enzyme sur les unités d'ADNr observée en l'absence de rapamycine.

Notons enfin que cette étude permettra de documenter un aspect peu étudié de la transcription Pol I, puisqu'à ce jour, peu de données mécanistiques relatives à cette enzyme sont disponibles.

II-2) Rappel sur le système de transcription spécifique Pol I *in vitro*

Il est possible de tester *in vitro* l'activité de transcription spécifique de la machinerie de classe I. On appelle système de transcription spécifique, un système qui permet la reconnaissance de la séquence promotrice d'un gène *in vitro*. Rappelons que les ARN Pol seules ne reconnaissent pas ces signaux et qu'il faut pour cela leur adjoindre des protéines appelées facteurs généraux de transcription. Pour la transcription de classe I

chez la levure, les facteurs de transcription de classe I associés (CF, UAF-TBP, Rrn3,...) sont requis.

Idéalement, un tel système est constitué par la Pol et les facteurs de transcription purifiés. Le laboratoire du Pr. Nomura a mis au point un tel système pour la transcription de l'unité d'ADNr de levure, mais son efficacité est extrêmement réduite (Keener et al., 1998). Nous ne savons pas si cette faible activité est liée à l'absence d'un composant (améliorant l'efficacité de transcription) ou à une purification non optimale des facteurs utilisés (conduisant par exemple à une inactivation partielle d'un ou de plusieurs composants) reste une question ouverte.

Le laboratoire dispose actuellement d'un système plus efficace mais plus rudimentaire composé d'un extrait protéique de levure (fraction PA600) obtenu après une seule étape de purification par chromatographie (Figure 36). (Milkereit and Tschochner, 1998). Cette fraction protéique, assez peu purifiée, est suffisante pour permettre la transcription spécifique *in vitro* d'une matrice d'ADN spécifique. Elle contient évidemment tous les facteurs de transcription de classe I caractérisés à ce jour (CF, UAF, TBP, complexe Pol I-Rrn3) et un grand nombre d'autres protéines, parmi lesquelles certaines pourraient participer à la transcription Pol I.

La matrice utilisée dans les tests de transcription *in vitro* est le plasmide YepSIRT (Musters et al., 1989). Ce plasmide porte une unité d'ADNr 35S dont une grande partie de la partie transcrite a été enlevée. *In vitro*, un transcrit spécifique de 681 nucléotides est obtenu lorsque le plasmide YepSIRT est incubé en présence de PA600.

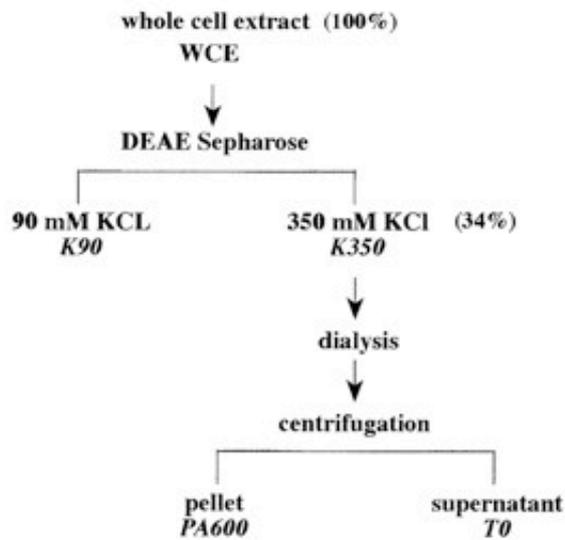
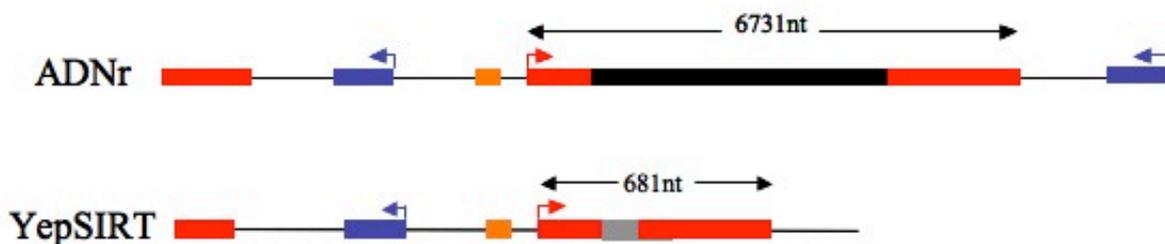
A**B**

Figure 36. Fraction PA600 et matrice YepSIRT utilisés lors d'un test de transcription spécifique *in vitro*.

(A) Protocole de purification de la fraction PA600 utilisée dans le test de transcription Pol I spécifique *in vitro* (Milkereit et al. 1998).

(B) Représentation schématique d'une unité d'ADNr et de la matrice YepSIRT. L'ADNr 5S et l'ADNr 35S sont représentés respectivement par des rectangles bleu et rouge. Le promoteur par une boîte orange. Le plasmide YepSIRT porte une unité d'ADNr dans laquelle une grande partie de la région transcrite par la Pol I est remplacée par une courte séquence divergente (en gris sur la figure)

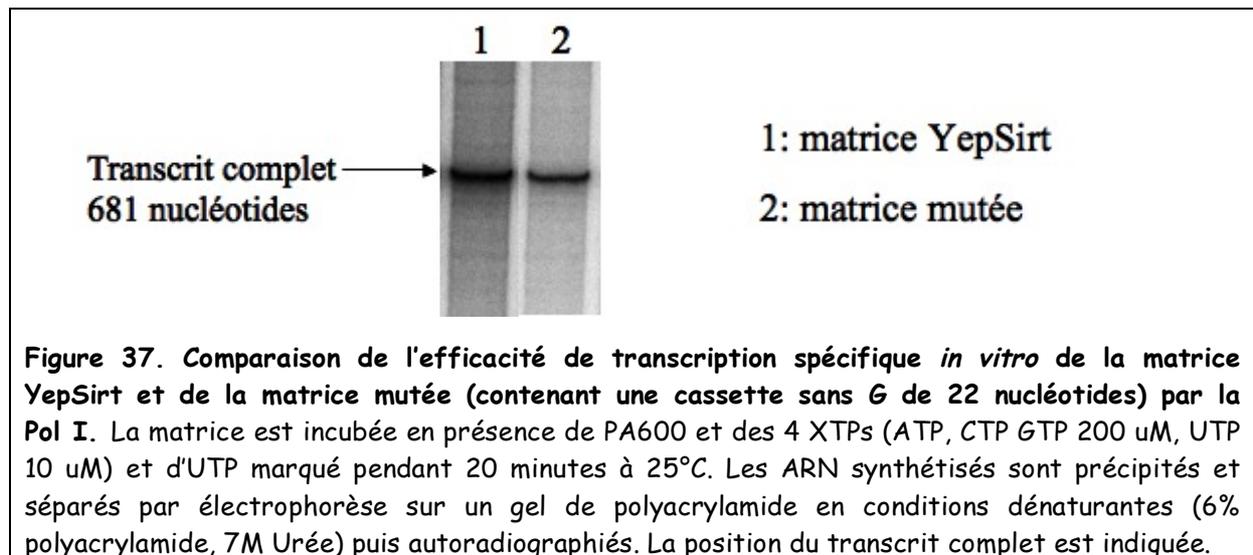
Dans des conditions standard de transcription, le plasmide YepSIRT est incubé en présence de la fraction PA600 et des 4 nucléotides triphosphates (incluant l' α - 32 P-UTP) pendant 20 minutes. Après arrêt de la réaction, les ARN néosynthétisés sont précipités et séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (6% acrylamide, 7M urée), puis révélés par autoradiographie. Ces conditions expérimentales ne permettent cependant pas d'appréhender la vitesse d'élongation de la transcription.

Les 6 premiers G de cette séquence (positions 3, 5, 9, 12, 15 et 18, en rouge ci-dessus) ont été mutés (en A et en C) afin d'obtenir une cassette sans G de 22 nucléotides. Après plusieurs essais de mutagenèse infructueux, nous avons finalement réussi à obtenir la version mutée de notre matrice grâce à deux PCR successives .

La première PCR est réalisée avec un couple d'amorces (dites externes) s'hybridant avec le plasmide pRS316 et un autre couple d'amorces s'hybridant avec la séquence du 35S à muter. Par cette étape nous obtenons deux fragments d'ADN ayant une séquence chevauchante (au niveau de la séquence mutée). La deuxième étape consiste à mélanger ces deux fragments et à les amplifier en utilisant les amorces externes. Le produit de cette PCR est ensuite digéré par l'enzyme SacI et cloné dans le plasmide pRS316.

Nous avons vérifié par digestion et par séquençage que les 6 premiers G de la séquence avaient bien été mutés.

Nous avons ensuite testé la transcription *in vitro* de la matrice mutée. Dans un premier temps, une transcription a été réalisée dans des conditions standard (i.e. en présence des 4XTP). Comme attendu, un ARN spécifique de 681 nucléotides est synthétisé dans ces conditions, de taille identique à celui obtenu à partir de la matrice non mutée (Figure 37). On peut cependant noter qu'en partant de la même quantité de matrice et de PA600, l'intensité du signal obtenu avec la matrice mutée est légèrement plus faible (Figure 37). Cette observation traduit vraisemblablement le fait que la séquence CORE du promoteur qui s'étend au-delà du +1 de la transcription (jusqu'à la position +8) et inclut des nucléotides que nous avons modifiés. Il a été montré en effet que des mutations de l'élément CORE se traduisent par une baisse de l'activité du promoteur (Musters et al., 1989).



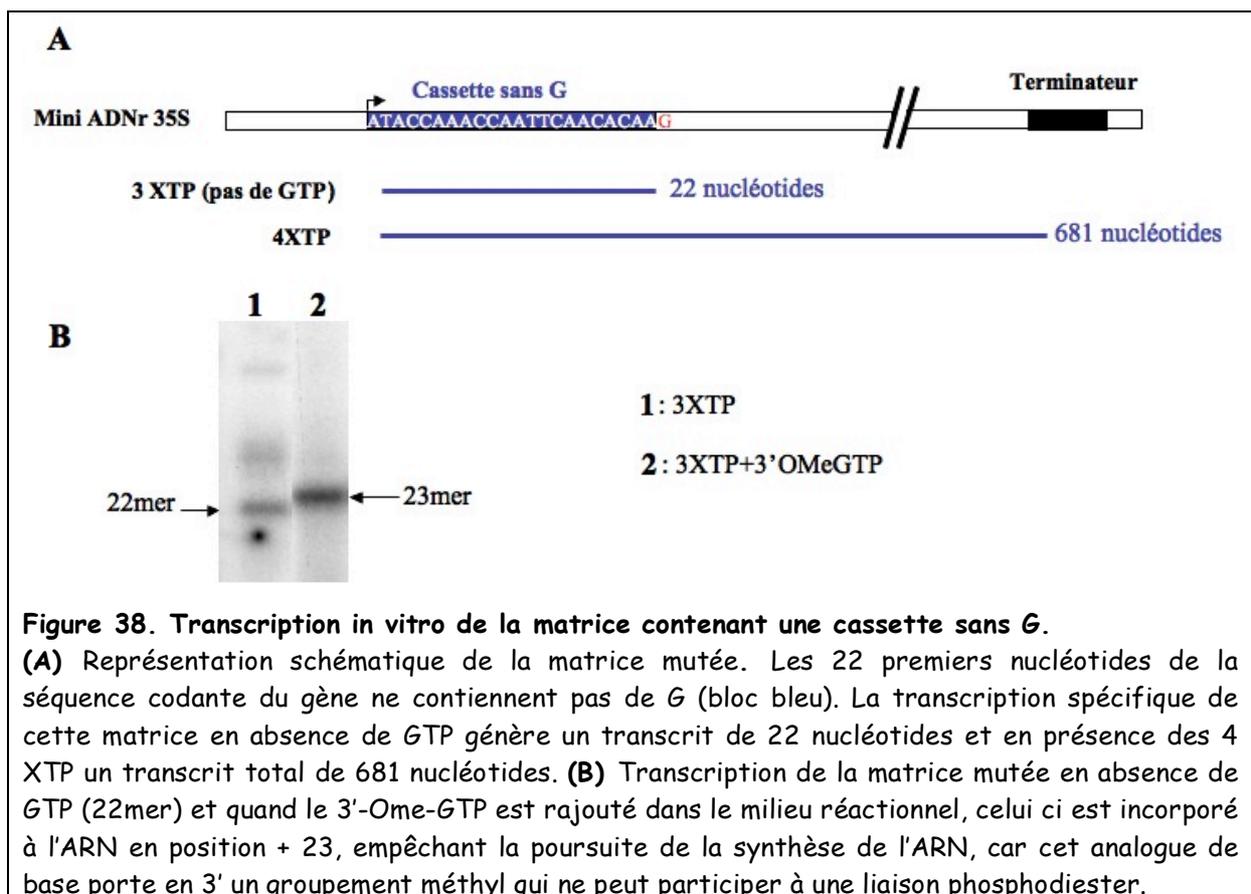
Nous avons ensuite testé la transcription de la matrice mutée en présence d'ATP, d'UTP et de CTP. Dans ces conditions, la Pol I devrait s'arrêter en élongation après la synthèse d'un 22 mer. Nous avons d'abord réalisé cette transcription dans les conditions standard (hormis l'absence de GTP) utilisées pour la synthèse du transcrit total (incubation de la matrice en présence du PA600 et des nucléotides pendant 30 minutes à 25°C), mais nous n'avons pas réussi à détecter de signal. Bien que décevant, ce résultat n'est pas très surprenant car le traceur radioactif est l'UTP et le 22 mer ne contient que 3 U alors que le transcrit complet en contient environ 190. La faible intensité attendue du signal spécifique en présence de 3 XTP nous a conduit à essayer d'optimiser les conditions de transcription. Nous avons en particulier rajouté au protocole décrit par Milkereit et col. une étape de pré-incubation de la matrice avec la fraction PA600 préalablement à l'ajout des nucléotides.

L'ajout de cette étape de pré-incubation nous a permis d'augmenter sensiblement le niveau de transcription en présence de 4 XTP. Nous avons retenu pour notre protocole un temps de pré-incubation de 3 heures, qui conduisait au signal le plus fort parmi les différents temps que nous avons testés.

Ces nouvelles conditions expérimentales nous ont permis d'obtenir un signal spécifique de la taille attendue (22 mer) quand la matrice mutée est transcrite en présence de 3 XTP (Figure 38). On constate cependant la présence de plusieurs transcrits de taille légèrement supérieure (Figure 38). Deux hypothèses simples pourraient permettre d'expliquer ce résultat :

- i) soit le site d'initiation de la transcription n'est pas unique dans ces conditions expérimentales
- ii) soit la présence d'un seul G à la position +22 n'est pas suffisante pour bloquer efficacement les complexes ternaires en élongation en l'absence de GTP

Afin de déterminer l'hypothèse correcte, nous avons réalisé la transcription de la matrice mutée en présence des 3 XTP et de 3'-O-Me-GTP. Cet analogue du GTP est efficacement incorporé par la polymérase dans l'ARN néosynthétisé, mais n'autorise plus l'élongation du transcrit à cause du groupement méthoxy en 3'. Dans ces conditions, nous observons la synthèse d'un transcrit unique de 23 nucléotides (Figure 38, puits 2). Ce résultat indique que conformément à ce qui a été décrit pour la transcription de l'ADNr 35S *in vivo* (Musters et al., 1989), le choix du +1 de la transcription est homogène dans nos conditions expérimentales.

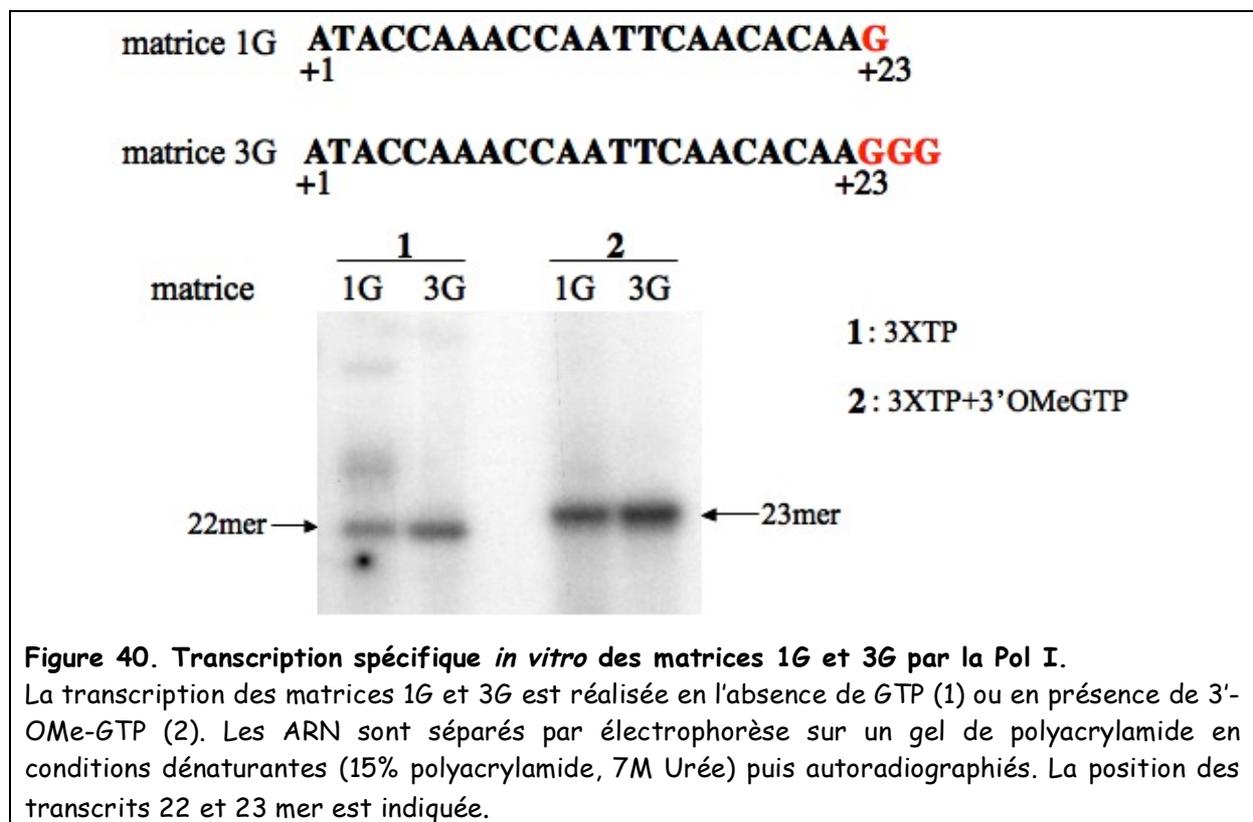


L'ensemble de ces données indique donc que la présence d'un seul G n'est pas suffisante pour bloquer de façon totalement efficace les complexes d'élongation de classe I.

Remarque : Ce résultat n'est finalement pas totalement surprenant. Des études similaires ont en effet été réalisées au laboratoire pour le système de transcription de classe III en utilisant le gène de l'ARNT Sup4 comme matrice. La séquence codante Wt de ce gène ne comprend pas de G jusqu'au nucléotide +18, un second G étant également présent en position +19. Lorsque cette matrice est transcrite en l'absence de GTP, on observe la synthèse d'un transcrit de 17 nucléotides, démontrant que la présence des deux G en positions +18 et +19 est suffisante pour bloquer efficacement les complexes d'élongation. Par contre, si l'on modifie la séquence de ce gène en remplaçant la guanosine en position +19 par une cytosine, on observe la synthèse de transcrits d'une taille supérieure à 17 nucléotides (Emilie Landrieux, communication personnelle et Figure 39). Ainsi, la présence d'un seul G s'avère là encore insuffisante pour bloquer quantitativement les complexes d'élongation de classe III.

On aurait pu imaginer que les Pol I et III, qui synthétisent in vivo des ARNs de taille très différente (respectivement près de 7 kB et 100 nucléotides en moyenne), présentent des propriétés de fidélité transcriptionnelle non équivalentes. Nos résultats suggèrent que cela n'est pas le cas. Il faudrait cependant réaliser des études beaucoup plus précises pour étayer cette conclusion. A cet égard, j'ai participé pendant ma thèse à l'analyse quantitative de la fidélité de la transcription Pol III (voir annexe 1), mais je n'ai pas eu la possibilité de réaliser une analyse similaire de la transcription Pol I, cette étude nécessitant la mise au point d'un système efficace de transcription spécifique totalement reconstitué (i. e. à partir de tous les composants impliqués purifiés).

est efficace pour le blocage quantitatif à la position +22 des complexes ternaires d'élongation.



II-4) Les complexes ternaires de classe I bloqués en élongation restent compétents pour la transcription

Il est ensuite nécessaire de vérifier que les complexes ternaires de classe I bloqués en élongation à la position +22 restent compétents pour la transcription quand le GTP est rajouté au milieu réactionnel. Des expériences préliminaires suggèrent que c'est le cas puisque quand la transcription est d'abord réalisée en présence de 3 XTP (synthèse du 22 mer) et qu'après 5 minutes de réaction, le GTP est ajouté, nous n'observons pas la présence du 22 mer (données non montrées). Ces conditions expérimentales ne sont cependant pas adaptées pour la mesure de la vitesse d'élongation. Pour ce faire, deux stratégies sont envisageables :

- i) Les complexes ternaires bloqués en position +22 sont purifiés par chromatographie de perméation afin d'éliminer les nucléotides radioactifs,

puis incubés en présence des 4 nucléotides froids pour permettre la reprise de l'élongation.

- ii) L'autre méthode ne comporte pas d'étape de purification des complexes ternaires. L'UTP radioactif ($1\mu\text{M}$) est donc toujours présent dans le milieu réactionnel et il suffit de rajouter les quatre nucléotides à la réaction après formation des complexes ternaires en ajoutant un très large excès d'UTP froid ($1,8\text{mM}$). Cet excès d'UTP froid va permettre de diluer fortement l'UTP marqué, et si l'on considère que l'on a environ 50 fois plus de U dans le transcrit total que dans le 22 mer, la radioactivité incorporée pendant la reprise en élongation représentera moins de 3% de la radioactivité préalablement incorporée dans le 22 mer. On peut donc négliger cette incorporation et suivre uniquement le signal engendré par l'élongation du 22 mer.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires qui ont démontré qu'il était possible de purifier par chromatographie de perméation les complexes ternaires de classe I bloqués sur la matrice en position +22. Cependant, cette méthode engendre une perte de matériel d'autant plus considérable que la quantité de complexes initialement formés est faible. Les conditions de transcription Pol I *in vitro*, même après optimisation, génèrent un signal spécifique d'une intensité bien plus faible que ce qui est observé par exemple pour la transcription Pol III. De fait, après l'étape de chromatographie, la quantité de complexes ternaires de classe I purifiés reste trop faible pour autoriser des analyses quantitatives subséquentes.

Faute d'avoir le temps de mettre au point un système de transcription plus efficace, nous nous sommes tournés vers la seconde stratégie décrite ci-dessus. Cette approche est certes moins rigoureuse, mais elle permet néanmoins de suivre la reprise de l'élongation du 22 mer dans des conditions satisfaisantes.

Les fractions PA600 Wt et CARA ont donc été incubées en présence de la matrice pendant 3 heures à $25\text{ }^\circ\text{C}$, puis l'ATP ($200\mu\text{M}$), le CTP ($200\mu\text{M}$) et l'UTP marqué ($1\mu\text{M}$) ont été ajoutés pour permettre la formation du 22 mer. Après 5 minutes de réaction,

les 4 nucléotides froids (ATP, CTP, GTP 600 μ M et UTP 1,8mM) sont rajoutés et des aliquotes sont prélevées à différents temps (0, 15, 45, 60 et 90 secondes). Les échantillons sont séparés en deux lots et les ARNs sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%, 7M urée pour le transcrit complet, et sur un gel à 15% de polyacrylamide, 7M urée pour le 22 mer. Après électrophorèse, les ARNs marqués sont visualisés par autoradiographie et quantifiés.

Les résultats obtenus montrent que les complexes ternaires de classe I Wt ou CARA bloqués en position + 22 par omission d'un nucléotide sont compétents pour la reprise de l'élongation (Figure 41).

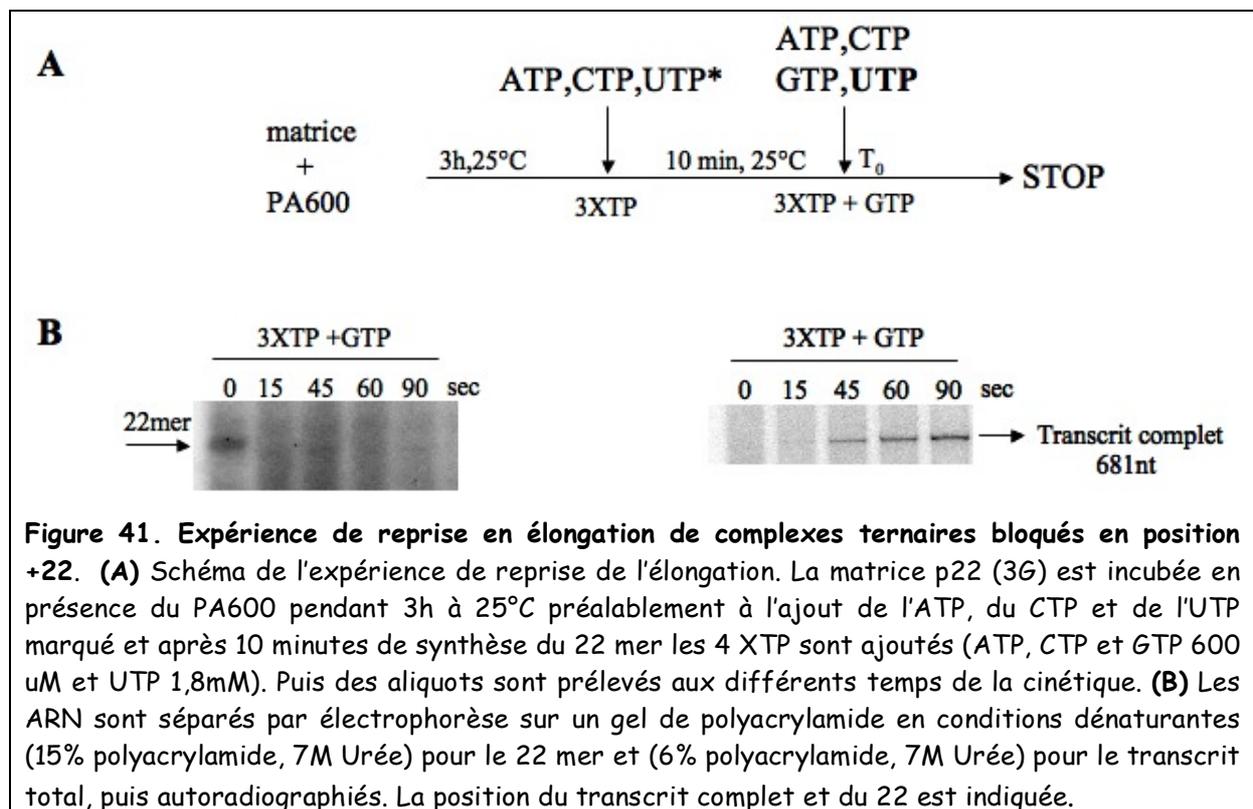


Figure 41. Expérience de reprise en élongation de complexes ternaires bloqués en position +22. (A) Schéma de l'expérience de reprise de l'élongation. La matrice p22 (3G) est incubée en présence du PA600 pendant 3h à 25°C préalablement à l'ajout de l'ATP, du CTP et de l'UTP marqué et après 10 minutes de synthèse du 22 mer les 4 XTP sont ajoutés (ATP, CTP et GTP 600 μ M et UTP 1,8mM). Puis des aliquotes sont prélevés aux différents temps de la cinétique. (B) Les ARN sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (15% polyacrylamide, 7M Urée) pour le 22 mer et (6% polyacrylamide, 7M Urée) pour le transcrit total, puis autoradiographiés. La position du transcrit complet et du 22 est indiquée.

On peut par ailleurs noter que la totalité des 22 mer synthétisés en l'absence de GTP sont allongés quand ce nucléotide est rajouté au milieu réactionnel. Nous n'avons jamais observé ce résultat quand des expériences similaires ont été réalisées avec la Pol III (on observe toujours une proportion plus ou moins importante de transcrits synthétisés en 3 XTP qui ne peut pas être allongée).

II-5) In vitro, la vitesse d'élongation de la Pol I Wt est plus rapide que celle de la Pol I CARA

La vitesse à laquelle apparaît le produit final est la résultante de la vitesse à laquelle la polymérase part de la position +22 et de sa vitesse d'élongation. Pour évaluer cette vitesse d'élongation, nous avons étudié à la fois la cinétique d'apparition du produit final et la vitesse de disparition du 22 mer.

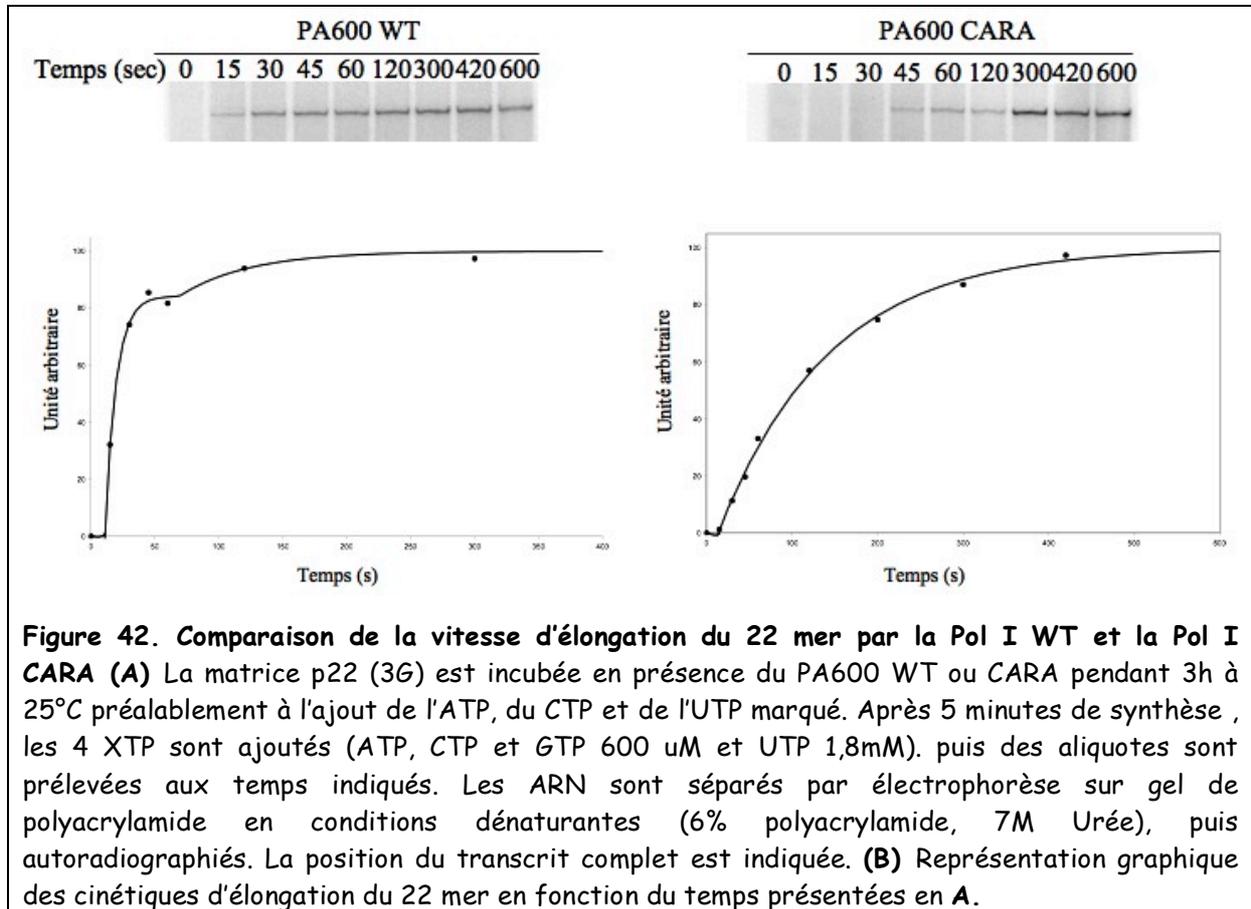
II-5-1) Etude des vitesses d'apparition du transcrit total

Pour comparer les vitesses d'apparition du transcrit complet des Pol I WT et CARA, nous avons étudié la cinétique d'élongation du 22 mer en transcrit complet. Ces expériences sont réalisées à partir de quantités de PA600 Wt et CARA permettant une synthèse équivalente de 22 mer (i.e. même nombre de complexes ternaires) lorsque la réaction est réalisée en absence de GTP afin de pouvoir comparer de façon qualitative et quantitative les résultats obtenus.

Les PA600 Wt et CARA ont donc été incubés en présence de la matrice pendant 3 heures à 25 °C, puis l'ATP (200 μ M), le CTP (200 μ M) et l'UTP marqué (1 μ M) ont été ajoutés pour permettre la formation du 22 mer. Après 5 minutes de réaction, les 4 nucléotides froids (ATP, CTP et GTP 600 μ M, et l'UTP à 1,8mM) sont rajoutés et des aliquotes sont prélevées à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 120, 300, 420 et 600 secondes). Les échantillons prélevés sont séparés en deux et soumis à une électrophorèse en condition dénaturante (gel de polyacrylamide 6%, 7M urée pour analyser le transcrit complet, et gel polyacrylamide 15%, 7M urée pour analyser le 22 mer).

Comme lors de l'étude de reprise de l'élongation (Figure 41), nos résultats montrent que pour les deux PA600 étudiés, le 22 mer n'est plus observable dès le premier temps de la cinétique ($t = 15s$). En ce qui concerne l'apparition du transcrit complet, nous observons pour les Pol I Wt et CARA un temps de latence avant l'apparition du signal qui correspond au temps que met la polymérase pour passer de la position +22 à la position

+681 (synthèse de 659 liaisons phosphodiesters). Les données bibliographiques indiquent que les ARN polymérases ADN-dépendantes incorporent environ 40 à 50 nucléotides par secondes. Si l'on admet qu'une Pol I quitte la position +22 dès que le GTP est rajouté au milieu, il lui faudra environs 15 secondes pour atteindre le terminateur du mini ADNr.



Nos résultats montrent que la vitesse d'apparition du transcrit complet est sensiblement plus rapide pour la Pol I Wt que pour la Pol I CARA (Figure 42).

Deux hypothèses pourraient expliquer ces observations :

- i) La Pol I CARA possède une vitesse d'élongation plus lente que la Pol I Wt
- ii) Les complexes ternaires contenant la Pol I CARA et bloqués en position +22 sont capables de reprendre moins efficacement l'élongation du transcrit en présence de GTP que ceux contenant la Pol I Wt

Ces deux hypothèses ne sont évidemment pas mutuellement exclusives et l'on peut également imaginer que la Pol I CARA présente ces deux types de défaut.

Afin de clarifier la situation, nous avons dans un premier temps comparé les vitesses auxquelles les complexes ternaires Wt et CARA bloqués en position + 22 étaient capables de reprendre l'élongation processive après l'ajout de GTP.

II-5-2) Estimation de la vitesse de départ de la position + 22 par les Pol I Wt et CARA

Une analyse précise de ces vitesses nécessiterait un système où la matrice transcrite serait modifiée d'une façon telle qu'après purification des complexes ternaires bloqués en position +22, l'on puisse mesurer les vitesses d'incorporation de 1, puis de 2 et enfin de 3 XTP (étude par « marche sur l'ADN » ou « DNA walking »). Pour les raisons explicitées précédemment, une telle étude est pour l'instant inenvisageable. Nous sommes donc contraints de faire une approximation et de considérer qu'elle est équivalente à la vitesse de disparition du 22 mer quand le GTP est ajouté. Cette vitesse n'est cependant pas accessible dans les conditions expérimentales utilisées jusqu'à présent puisque le 22 mer disparaît beaucoup trop rapidement pour pouvoir mesurer une constante de vitesse apparente (dès 10 secondes de cinétique après ajout des nucléotides froids, le 22 mer a totalement disparu). Il fallait donc trouver un moyen pour ralentir la réaction. Une problématique similaire relative à l'analyse mécanistique de la transcription Pol III avait été résolue au laboratoire en diminuant la température à laquelle l'expérience était réalisée de 25°C à 16°C (Alic et al., 2007).

Nous avons testé l'effet d'une diminution de la température sur la vitesse d'élongation du 22 mer par la Pol I. La synthèse du 22 mer (3 XTP) a été réalisée selon le protocole habituel à 25°C puis la réaction a été transférée dans un bloc réfrigéré à 16°C et après équilibration de la température, les 4 XTP ont été rajoutés. L'analyse des aliquots prélevés aux différents temps de la cinétique montre que le signal du 22 mer n'est plus observable dès le premier prélèvement (10 secondes). Nous avons donc décidé d'étudier la réaction à 4°C mais de façon surprenante, les résultats obtenus ont été les mêmes qu'à 25°C ou 16°C.

Remarque : Ces expériences ont été réalisées avec un PA600 CARA en considérant que la Pol I CARA était plus lente que la Pol I Wt (d'après les données obtenues pour l'étude des vitesses d'apparition du transcrit total).

A défaut de résoudre notre problème, ces expériences suggèrent que la vitesse d'élongation *in vitro* de la Pol I est beaucoup plus élevée que celle de la Pol III et/ou que les vitesses d'élongation de ces deux enzymes répondent différemment à la température.

La diminution de la température de réaction n'ayant pas d'effet apparent sur la vitesse d'élongation de la Pol I, nous avons dans un second temps modifié un autre paramètre : la concentration en GTP puisque ce nucléotide est le premier à être incorporé lors de l'élongation du 22 mer. Nous avons mesuré l'effet de différentes concentrations de GTP (6 μ M, 600nM, 60nM et 6nM) sur la vitesse de disparition du 22 mer et ce n'est qu'à 6 nM que nous avons observé une cinétique de disparition du 22 mer suffisamment lente pour pouvoir mesurer une constante de vitesse apparente (Figure 43).

Pendant la période où nous avons étudié l'effet de la température et de la concentration en GTP sur la vitesse de disparition du 22 mer, nous avons été amenés à construire une nouvelle matrice contenant une cassette sans G plus longue et dont la transcription en l'absence de GTP aboutit à la formation d'un 60 mer (le but de cette construction sera expliqué dans le paragraphe II-5-4). Nous avons préféré étudier la cinétique de disparition du 60 mer à 6 nM plutôt que celle du 22 mer pour deux raisons :

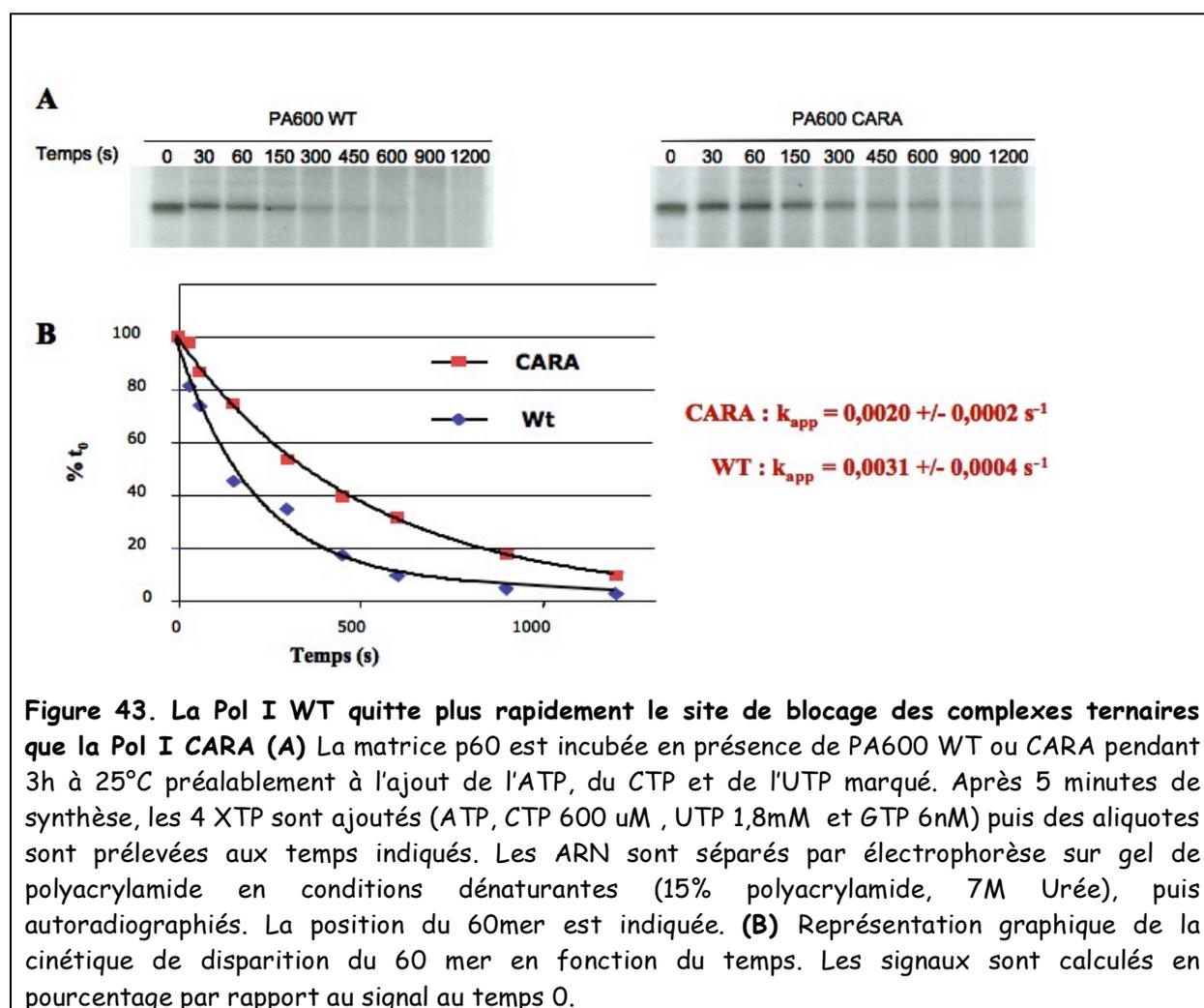
- i) Le signal du 60 mer se situe assez haut dans le gel et n'est donc pas affecté par le bruit de fond permettant ainsi une quantification plus exacte.
- ii) L'intensité du signal généré par le 60 mer est plus forte que le signal du 22 mer qui comprend quatre fois moins d'uracil dans sa séquence. Ce qui facilite ainsi la quantification.

Les résultats obtenus avec cette matrice montrent qu'en présence de 6 nM de GTP, le 60 mer disparaît environ 1,5 fois plus rapidement lorsque la réaction d'élongation est

catalysée par la Pol I Wt (Figure 43). Cette différence est somme toute assez modeste. Elle est observée à une concentration limitante de GTP et il est difficile de savoir comment elle évoluerait en présence d'une concentration saturante de ce nucléotide.

Remarque : Rappelons que les expériences d'élongation du 22 mer (voir Figure 41) sont réalisées en présence de 600 μ M de GTP, concentration que nous avons démontrée comme étant saturante pour la Pol III (Alic et al., 2007). Il est donc tentant de spéculer que c'est également le cas pour la Pol I.

Avant d'essayer de conclure si la vitesse de reprise en élongation processive des complexes ternaires bloqués à la position +22 (ou +60) peut ou non influencer de façon significative la vitesse d'apparition du transcrit total (i.e. « full-length »), nous avons quantifié les cinétiques d'élongation du 22 mer par les Pol I Wt et CARA en présence de 4 XTP.



II-5-3) Estimation de la vitesse d'élongation de la transcription des Pol I Wt et CARA

Cinq cinétiques d'élongation du 22 mer par la Pol I Wt et la Pol I CARA ont été réalisées indépendamment dans les conditions décrites paragraphe II-4-1. Pour chaque temps de la cinétique, le signal correspondant au transcrit spécifique total a été quantifié par le logiciel ImageJ . Les courbes correspondant aux cinétiques d'apparition du transcrit total en fonction du temps permettent de faire deux remarques :

- i) Ainsi qu'il l'a été mentionné dans le paragraphe II-4-1, nous observons de façon reproductible une vitesse d'apparition du transcrit complet plus rapide pour la Pol I Wt que pour la Pol I CARA
- ii) Alors que pour la Pol I CARA, la cinétique d'apparition du transcrit est monophasique et peut être modélisée après le temps de latence par une exponentielle simple (ordre apparent de 1), nous observons de façon systématique une courbe biphasique pour la Pol I Wt. Avant d'atteindre la totalité des 22 mer synthétisés (100% des transcrits), la courbe passe par un plateau aux alentours des temps 45-60 secondes.. En première approximation, nous négligerons cette seconde phase, quantitativement minoritaire, et nous considérerons que la synthèse du transcrit total par la Pol I Wt est monophasique et qu'elle peut également être modélisée après le temps de latence par une exponentielle simple (ordre apparent de 1). Dans un second temps, nous reviendrons sur l'aspect biphasique de cette courbe (voir paragraphe II-4-2).

Les courbes d'apparition du transcrit total peuvent dans un premier temps être modélisées par une équation de la forme $Y = A (1 - e^{-kt})$. Pour les 5 cinétiques réalisées, les constantes de vitesse apparente k (pour la Pol I Wt) et k' (pour la Pol I CARA) ont été calculées. Les résultats (indiqués en s^{-1}) sont les suivants :

$$k = 0,09 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$$

$$k' = 0,011 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$$

Le rapport k/k' est environ égal à 8. Si l'on revient maintenant aux données obtenues pour la synthèse des trois premières liaisons phosphodiester (voir paragraphe II-4-2) en présence d'une concentration limitante de GTP (6 nM), nous avons observé que la Pol I Wt était environ une fois et demie plus rapide que la Pol I CARA. Ce chiffre est bien inférieur au rapport k/k' mesuré.

L'ensemble de ces données nous amène donc à proposer que la Pol I CARA est affectée dans l'étape d'élongation de la transcription. Les constantes de vitesse mesurées suggèrent que cette forme d'enzyme est 5 à 8 fois plus lente que la Pol I Wt in vitro.

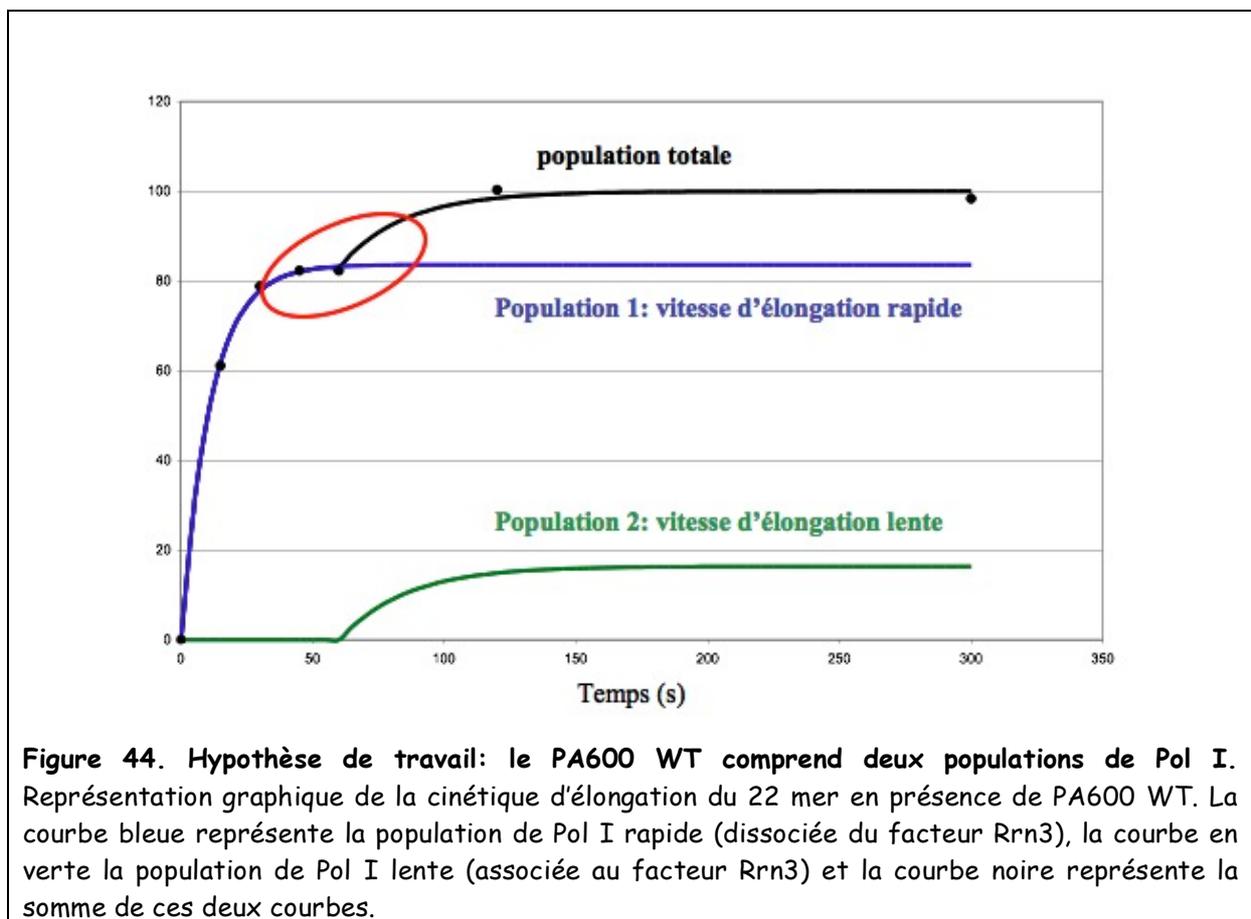
Dans la Pol I CARA, le facteur Rrn3 est lié de façon covalente à l'enzyme alors que cette association est transitoire pour la Pol I Wt. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la formation du complexe Pol I-Rrn3 est strictement requise pour l'initiation de la transcription, mais le facteur Rrn3 se dissocie de l'enzyme (*in vitro* et *in vivo*) à une étape précoce de l'élongation. Ce mécanisme est conservé de la levure à l'homme. Nos données suggèrent que cette dissociation est importante pour permettre une élongation de la transcription efficace. Cela pourrait par exemple être le cas si la dissociation du facteur Rrn3 s'accompagnait d'un changement de conformation de l'enzyme, plus propice à la synthèse des liaisons phosphodiesters (conformation « rapide »). Une autre hypothèse non exclusive serait qu'un facteur d'élongation de classe I (encore non caractérisé) ne pourrait interagir avec la polymérase qu'après dissociation du facteur Rrn3

II-5-4) Existe-t-il une population hétérogène de Pol I dans le PA600 Wt ?

Comme nous l'avons mentionné au début du paragraphe précédent, les cinétiques d'élongation du 22 mer obtenues avec le PA600 Wt sont biphasiques (inflexion vers le temps 100 secondes, voir Figure 44).

La première question est de savoir s'il s'agit ou non d'un artefact expérimental. Le fait que cette inflexion soit observée de façon récurrente pour toutes les expériences d'élongation du 22 mer réalisées à partir d'un PA600 Wt (et ceci avec 3 PA600 préparés de façon totalement indépendante) milite pour la réalité de ce caractère biphasique. On peut d'ailleurs noter que les courbes obtenues à partir des différents PA600 CARA sont systématiquement monophasiques.

Cette observation suggère qu'il existe dans le PA600 Wt au moins deux populations de Pol I : une population majoritaire rapide (permettant l'obtention de la première partie rapide de la courbe) et une population minoritaire plus lente (seconde partie de la courbe) (figure 44).



En modélisant la cinétique d'apparition du transcrit de chacune des sous-populations de polymérase sous forme d'une exponentielle simple avec délai, la cinétique d'apparition du mélange devient :

$$f(t) = P_1 \cdot (1 - \exp(-k_1(t - T_1))) \cdot H(t - T_1) + P_2 \cdot (1 - \exp(-k_2(t - T_2))) \cdot H(t - T_2)$$

Avec :

$H(t)$ fonction de Heaviside, nulle pour $t < 0$ et égale à 1 pour $t \geq 0$;

P_1 et P_2 proportions de polymérases rapides et lentes respectivement ;

k_1 et k_2 constantes de vitesses apparentes des polymérases rapides et lentes respectivement ;

T_1 et T_2 temps nécessaire à la synthèse des premiers transcrits totaux par les polymérases rapides et lentes respectivement.

Pour déterminer expérimentalement ces différents paramètres, Peggy Baudouin-Cornu du Laboratoire de Biologie Intégrative, a cherché à approximer les données expérimentales avec la fonction ci-dessus. Pour cela, elle n'a pris en compte que les points expérimentaux non nuls et a utilisé la toolbox EzyFit (<http://www.fast.u-psud.fr/ezyfit/>) sur Matlab et la fonction :

$$f(t) = P_1 \cdot (1 - \exp(-k_1(t - T_1))) + P_2 \cdot \frac{(1 - \exp(-k_2(t - T_2)))}{(1 + \exp(-4(t - T_2)))}$$

Remarque : Comme les points expérimentaux nuls ne sont pas pris en compte, il est inutile d'utiliser la fonction $H(t - T_1)$ dans le premier membre de cette fonction. Le

facteur $\frac{1}{(1 + \exp(-4(t - T_2)))}$ est une approximation infiniment dérivable de $H(t - T_2)$.

5 cinétiques indépendantes (incluant 2 PA600 différents) ont ainsi pu être approximées. Les paramètres T_1 , T_2 , P_1 , P_2 , k_1 et k_2 obtenus sont récapitulés ci-dessous :

$$T_1 = 6,4 \pm 4,0 \text{ s}$$

$$T_2 = 54,6 \pm 20,7 \text{ s}$$

$$P_1 = 75,8 \pm 9 \%$$

$$P_2 = 24,2 \pm 9 \%$$

$$k_1 = 0,082 \pm 0,018 \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 0,018 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$$

On constate que la constante de vitesse apparente d'élongation k_2 est du même ordre que k' ($= 0,011 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$), la constante de vitesse apparente d'élongation calculée pour la Pol I CARA.

Ces résultats nous amènent donc à proposer que les deux populations de Pol I qui coexistent dans le PA600 Wt correspondent d'une part aux polymérases dissociées du facteur Rrn3 (population rapide P1) et d'autre part aux molécules d'enzyme qui seraient toujours associées au facteur Rrn3 (population lente P2).

Cette hypothèse, aussi séduisante soit-elle, appelle néanmoins une remarque importante. Ces observations ayant été faites lors de la synthèse du transcrit complet après la formation du 22 mer, il faut admettre que la population P2 non dissociée reste en fait non dissociable pendant toute la réaction. Comme indiqué dans l'introduction, la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 est un phénomène complexe qui fait intervenir une combinaison de modifications post-traductionnelles s'exerçant sur le facteur Rrn3 et la Pol I. Cette dissociation a déjà été observée *in vitro* dans le PA600 et il est concevable d'imaginer qu'au sein de cette fraction, ces réactions ne sont pas totales, conduisant à la dissociation d'une partie seulement des complexes Pol I-Rrn3. Si tel est le cas, pour un même PA600, la proportion de complexes non-dissociables doit être indépendante de la matrice utilisée.

Une autre possibilité, plus complexe, consisterait à imaginer que la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 est un mécanisme dynamique étroitement lié à l'entrée en élongation processive. Plusieurs données obtenues *in vitro* et *in vivo* suggèrent en effet que cette dissociation a lieu à une étape précoce de l'élongation. En particulier, Tschochner et col. ont montré en utilisant une matrice contenant une cassette sans C que le facteur Rrn3 était dissocié de la Pol I après synthèse d'un 35 mer (Bier et al., 2004). Les données expérimentales présentées dans ce papier ne permettent cependant pas de dire si la dissociation observée est quantitative ou non. Il est donc concevable que la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 soit concomitante ou légèrement postérieure à l'entrée en élongation processive, et que cette dissociation soit subordonnée à la synthèse du transcrit. Ainsi, les complexes ternaires bloqués à la position +22 (donc à

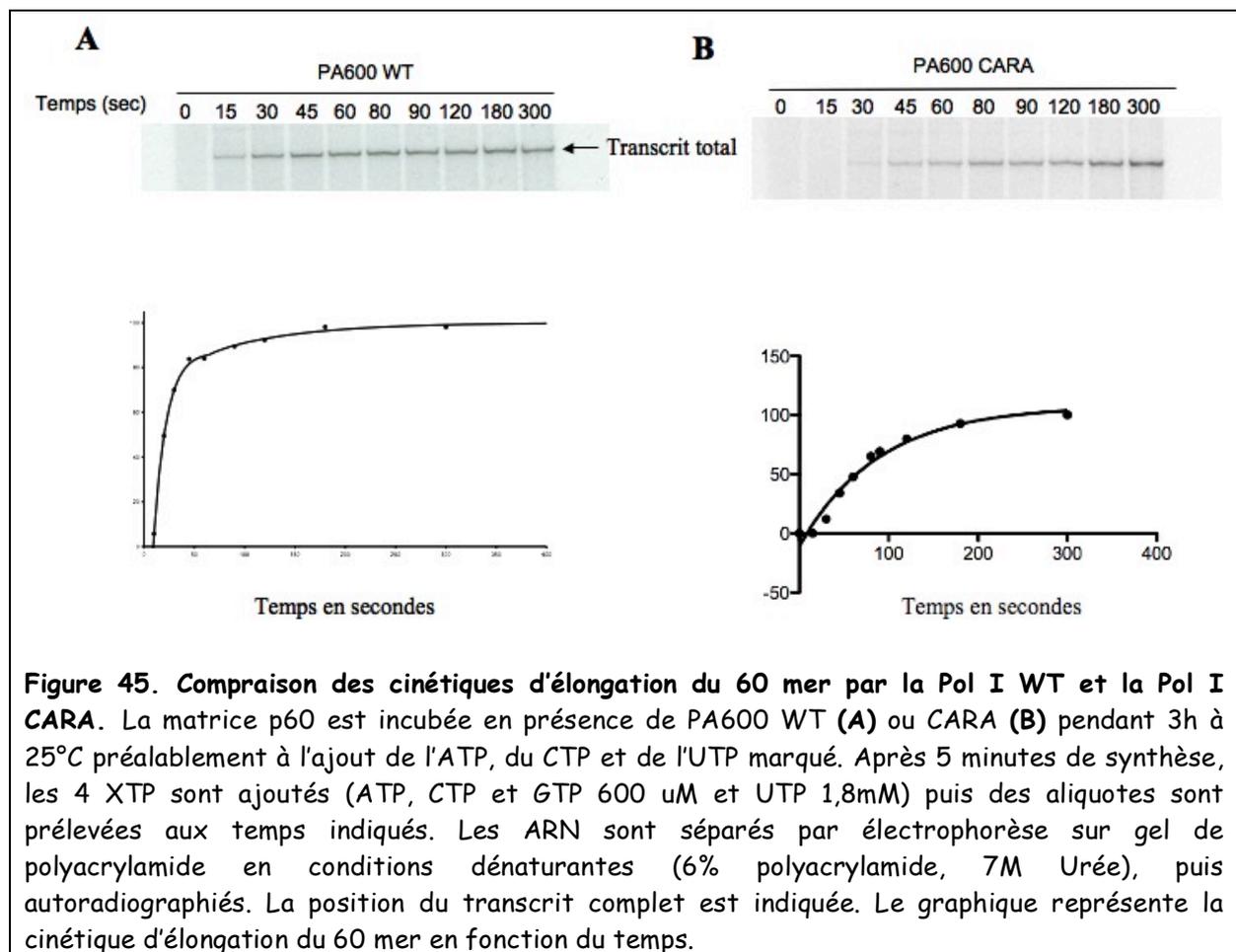
mélangés et l'amplification est faite grâce aux amorces externes. Le produit de cette PCR est digéré par l'enzyme SacI de même que le plasmide pRS316 puis une étape de ligation permet d'introduire la nouvelle séquence dans le plasmide pRS316.

Nous avons vérifié par séquençage que tous les G étaient bien remplacés dans les 60 premiers nucléotides et que la transcription en absence de GTP de cette nouvelle matrice générait un ARN de 60 nucléotides.

Nous avons ensuite étudié la cinétique d'élongation du 60 mer à partir des PA600 WT et CARA en utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour la cinétique d'élongation du 22 mer (voir paragraphe II-4-1). Après quantification des signaux, nous avons tracé les courbes correspondant à l'apparition du 60 mer en fonction du temps.

Pour le PA600 CARA, nous obtenons une courbe monophasique comme celle obtenue pour l'élongation du 22 mer (figure 45). et nous retrouvons une constante de vitesse apparente k'' très proche de celle calculée pour la cinétique d'élongation du 22 mer ($k'' = 0,0095 \text{ s}^{-1}$ versus $k' = 0,011 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$).

Pour le PA600 WT, nous observons encore une courbe biphasique dont l'aspect global est proche des courbes obtenues lors de l'élongation du 22 mer, mais pour laquelle la transition (qui a toujours lieu vers 100 secondes) semble se produire à un niveau plus élevé que précédemment (figure 45).



Rappelons que la question à laquelle nous souhaitons répondre est de savoir si les pourcentages P1 (population rapide) et P2 (population lente) sont identiques ou non, selon que l'on regarde l'élongation du 22 mer ou du 60 mer. Nous avons extrait les nouveaux paramètres T1, T2, P1, P2, k_1 et k_2 à partir de 5 cinétiques indépendantes selon l'approche décrite précédemment. Les résultats obtenus sont indiqués ci-dessous :

$$T1 = 9,2 \pm 2,0 \text{ s}$$

$$T2 = 69,7 \pm 12,6 \text{ s}$$

$$P1 = 89,1 \pm 5,5 \%$$

$$P2 = 10,8 \pm 5,5 \%$$

$$k_1 = 0,085 \pm 0,009$$

$$k_2 = 0,01 \pm 0,004$$

Conformément à ce que l'on pouvait attendre, nous n'observons pas de variations significatives des paramètres T_1 , T_2 , k_1 et k_2 . Ce résultat est satisfaisant et valide la modélisation de ce système. En ce qui concerne les paramètres P_1 , nous avons obtenu des valeurs supérieures à celles déterminées pour l'élongation du 22 mer (Figure 42).

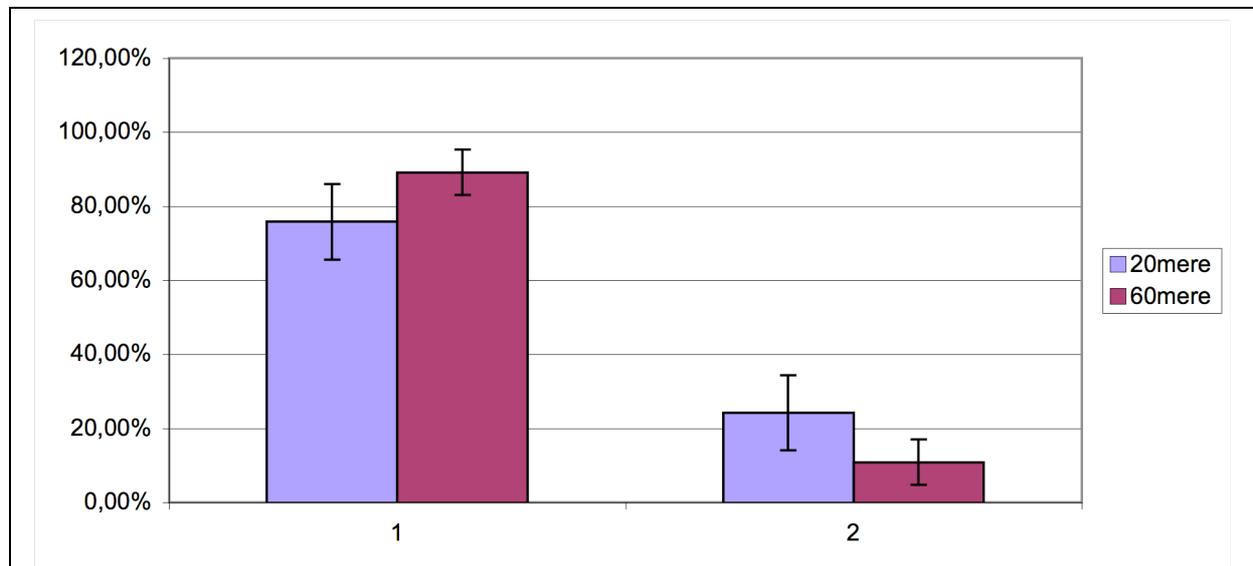


Figure 46 : graphique représentant les proportions des populations de Pol I lente (2) et rapide (1) lors de l'élongation du 22 et du 60 mer. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur 5 expériences.

La question est donc de savoir si ces valeurs sont significativement différentes. Pour statuer, Peggy a réalisé un test de Mann-Whitney (voir Marériel et Méthodes) sur les valeurs numériques obtenues pour les 5 cinétiques réalisées pour chacune des matrices (sample A : valeurs de P_1 pour l'élongation du 60 mer et sample B : valeurs de P_1 pour l'élongation du 22 mer).

Mean Ranks for					
Sample A	Sample B	$U_A =$		$P(1)$	$P(2)$
7.4	3.6	3		0.0301	0.0601
		$z =$	1.88		

Note that mean ranks are provided only for descriptive purposes. They are not part of the Mann-Whitney test.

Critical Values of U for $n_a=5; n_b=5$

	Level of Significance for a Directional Test		
	.05	.025	.01
	Non-Directional Test		
	--	.05	.02
lower limit	4	2	1
upper limit	21	23	24

S = Smaller Sample Size

U	1	2	3	4	5	U
0	0.167	0.048	0.018	0.008	0.004	0
1	0.333	0.095	0.036	0.016	0.008	1
2	0.500	0.190	0.071	0.032	0.016	2
3	0.667	0.286	0.125	0.056	0.028	3
4	0.833	0.429	0.196	0.095	0.048	4
5	1.000	0.571	0.286	0.143	0.075	5
6		0.714	0.393	0.206	0.111	6
7		0.810	0.500	0.278	0.155	7
8		0.905	0.607	0.365	0.210	8
9		0.952	0.714	0.452	0.274	9
10		1.000	0.804	0.548	0.345	10
11			0.875	0.635	0.421	11
12			0.929	0.722	0.500	12
13			0.964	0.794	0.579	13
14			0.982	0.857	0.655	14
15			1.000	0.905	0.726	15
16				0.944	0.790	16
17				0.968	0.845	17
18				0.984	0.889	18
19				0.992	0.925	19
20				1.000	0.952	20
21					0.972	21
22					0.984	22
23					0.992	23
24					0.996	24
25					1.000	25

Probabilité d'avoir la valeur U pour deux échantillons issus de la même population:

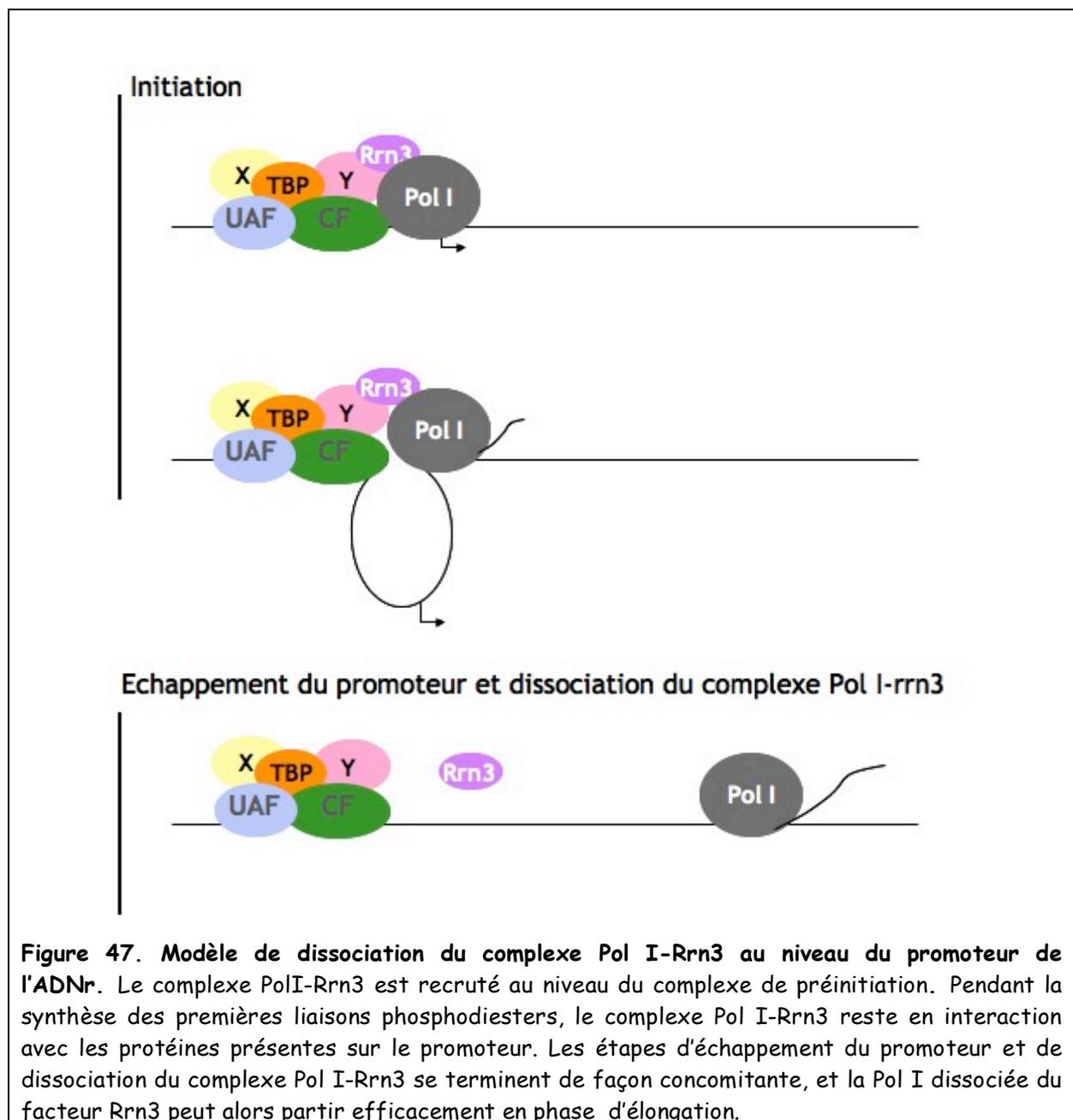
$$0,028 * 2 = 5,6\%$$

Comme on le constate ci-dessus, la probabilité que l'ensemble des valeurs P1 mesurées pour le 22 mer et pour le 60 mer soit différente est de l'ordre de 95%. Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de la longueur de la cassette sans G de la matrice conduit à une augmentation significative de la proportion de complexes Pol I-Rrn3 dissociés.

Ces résultats suggèrent donc fortement que la première hypothèse que nous avons formulée (présence limitante dans les PA600 d'un composant requis pour la dissociation du complexe Pol I-Rrn3) n'est pas recevable. Les données obtenues sont compatibles avec notre seconde hypothèse et nous amènent à proposer un modèle relatif à la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 (Figure 47).

- 1) La présence du complexe Pol I-Rrn3 sur le promoteur de l'ADNr est requise pour l'initiation de la transcription
- 2) Pendant la synthèse des premières liaisons phosphodiester, la Pol I (toujours associée au facteur Rrn3) reste en interaction avec des protéines présentes au niveau du promoteur
- 3) Les mécanismes moléculaires contrôlant la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 nécessitent que l'interaction du complexe avec certaines protéines présentes au niveau du promoteur perdure pendant les premières translocations du site actif
- 4) L'étape d'échappement du promoteur et la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 se terminent de façon concomitante, permettant à la Pol I dissociée du facteur Rrn3 de réaliser efficacement l'étape d'élongation de la transcription

Remarque : a priori, nous pensons qu'il n'y a pas de relation de subordination entre échappement du promoteur et dissociation du complexe Pol I-Rrn3, puisque la Pol I CARA est capable de quitter le promoteur pour rentrer en élongation.



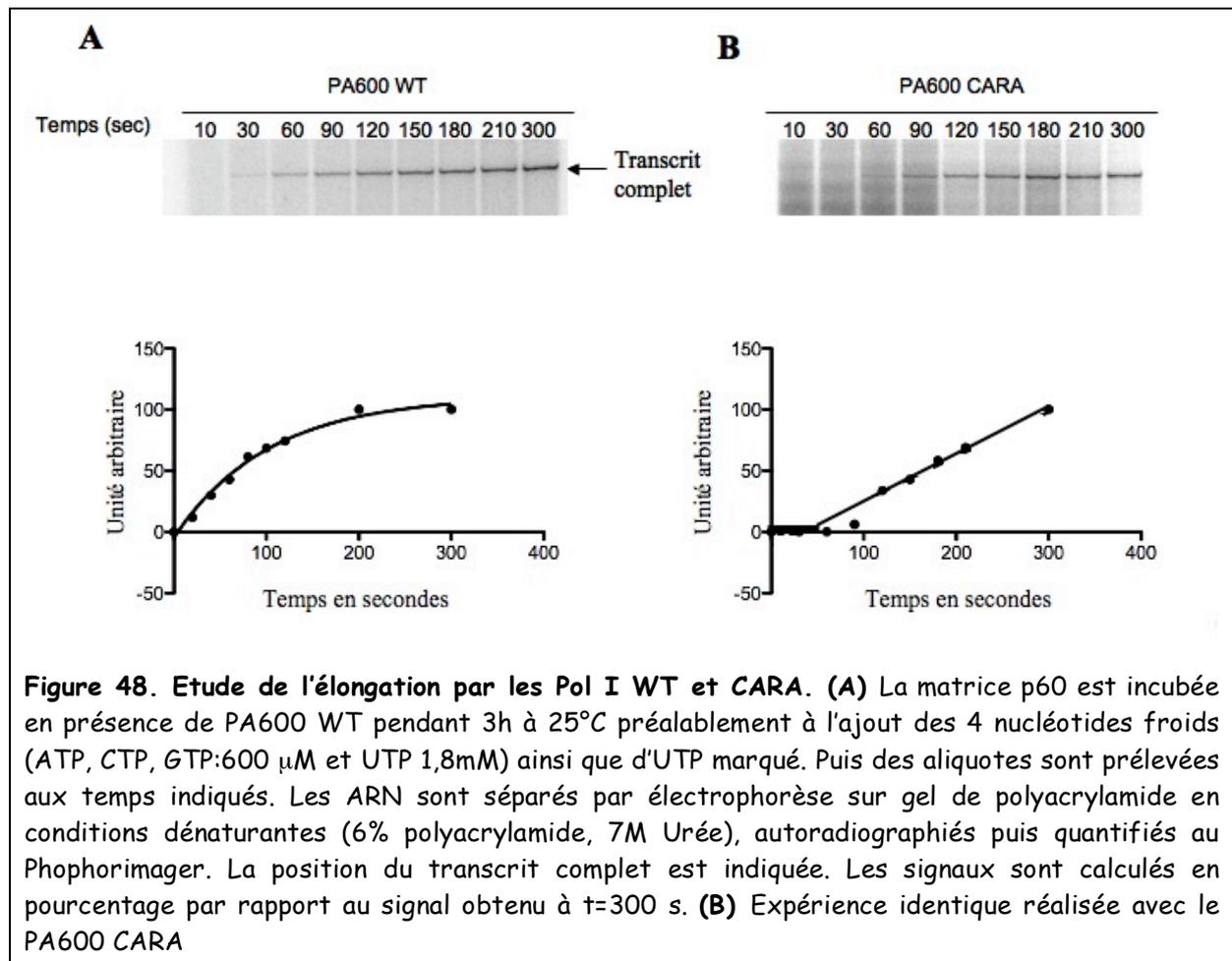
Dans le cas des complexes ternaires bloqués en position +22 (ou +60) pendant plusieurs minutes à cause de l'absence de GTP, nous proposons que les interactions entre le complexe Pol I-Rrn3 et certaines protéines présentes au niveau du promoteur se rompent, avant que la totalité des complexes ne soit dissociée. Une fois ces interactions rompues, les complexes non dissociés deviennent non dissociables.

Si ce modèle est correct, on s'attend à perdre le caractère biphasique de la courbe d'apparition du transcrit total quand la synthèse est directement faite en présence de 4 XTP.

II-5-6) Vitesse d'élongation de la Pol I WT sans synthèse préalable du 60mer

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la vitesse d'apparition du transcrit total pour la Pol I Wt, sans étape préalable de formation des complexes ternaires bloqués à la position +60.

La matrice est préincubée en présence de la fraction PA600 Wt pendant 3 heures, puis les 4 nucléotides sont ajoutés dans le milieu réactionnel en même temps que l'UTP marqué. Des aliquotes sont prélevées à 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et 300 secondes, et les échantillons sont traités comme décrit précédemment. Après quantification des signaux, nous obtenons dans ces conditions une courbe monophasique d'apparition du transcrit complet (Figure 48), suggérant la présence d'une population homogène de Pol I (au moins en terme de vitesse de synthèse). Ce résultat renforce donc notre hypothèse et suggère que dans ces conditions expérimentales, tous les complexes Pol I-Rrn3 engagés dans la transcription de la matrice sont dissociés.



Remarque 1 : La constante de vitesse apparente d'apparition du transcrit complet déterminée à partir de plusieurs cinétiques (3) dans les conditions précédentes est de l'ordre de $0,01 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur est environ 10 fois plus faible que celle mesurée lors de l'élongation du 60 mer (voir partie II-2-5). Cette observation reflète vraisemblablement le fait que lorsque la transcription est directement réalisée en présence des 4 XTP, la vitesse apparente de synthèse du transcrit complet dépend des vitesses relatives des premières étapes du cycle transcriptionnel (i.e. initiation, échappement du promoteur et élongation processive). Lors de l'élongation du 60 mer, l'initiation de la transcription et l'échappement du promoteur ont déjà eu lieu, et l'élongation du transcrit est mesurée à partir de complexes ternaires stables dans lesquels l'extrémité 3' du transcrit reste positionnée au niveau du site actif de l'enzyme. Nos données suggèrent donc qu'in vitro, les vitesses d'initiation de la transcription et/ou d'échappement du promoteur sont cinétiquement limitantes.

Remarque 2 : L'allure de la courbe d'apparition du transcrit complet obtenue avec le PA600 Wt démontre que les molécules de Pol I engagées dans la transcription de la matrice ne réalisent qu'un seul cycle transcriptionnel (transcription « single round »). Ce résultat n'est pas une surprise puisqu'il a déjà été démontré qu'en utilisant des fractions PA600, l'enzyme n'est plus capable de se réassocier au facteur après dissociation des complexes Pol I-Rrn3 (Milkereit and Tschochner, 1998). Si l'on réalise la transcription de la matrice directement avec les 4 XTP et la fraction PA600 CARA, la courbe d'apparition du transcrit complet a l'allure d'une droite pendant la durée de la cinétique (Figure 48, B). Ce résultat montre qu'une molécule de Pol I CARA est capable de réaliser plusieurs cycle de transcription (soit en réinitiant sur la matrice qu'elle vient de transcrire, soit en initiant la transcription sur une autre molécule de matrice).

En conclusion, nos résultats suggèrent que le complexe Pol I-Rrn3 se dissocie de façon précoce, de façon concomitante à l'étape d'échappement du promoteur. Cette dissociation est importante car elle modifie (directement ou non) la vitesse de synthèse du transcrit. Chez la levure, aucun défaut de croissance n'est observé si l'on empêche la dissociation du complexe PolI-Rrn3 (ce point sera cependant discuté dans la partie III). Ce résultat est d'autant plus surprenant que la différence des vitesses apparentes d'élongation des Pol I Wt et CARA est importante. Une approche similaire dans des cellules de souris conduit à un tout autre résultat : la liaison covalente entre le facteur TIF-IA (l'homologue murin de Rrn3) et la Pol I n'est pas viable, et entraîne l'inhibition de la transcription Pol I, la perturbation de la structure nucléolaire et l'arrêt du cycle cellulaire (Bierhoff et al., 2008). Il est difficile d'expliquer pourquoi, contrairement à la levure, la dissociation du complexe est critique chez la souris. En effet non seulement la Pol I et le facteur Rrn3 sont conservés de la levure à l'homme, mais les mécanismes contrôlant la formation et la dissociation du complexe semblent de même nature (phosphorylations/déphosphorylations multiples) (Fath et al., 2001; Mayer et al., 2004). Enfin, pour ces deux organismes, la dissociation (ou la non formation) du complexe Pol I-Rrn3 est le paramètre clé pour la répression de la transcription Pol I en

réponse à la rapamycine (Claypool et al., 2004; Mayer et al., 2004), aux stress ribotoxiques et aux carences en nutriments .

Des études complémentaires devront être menées chez la souris pour déterminer si la dissociation du complexe Pol I-TIF IA est strictement requise pour l'échappement du promoteur, l'élongation processive ou l'interaction de la Pol I avec un facteur nécessaire à la transcription efficace de l'ADNr 47S.

II-5-7) Mécanistique de la Pol I et densité d'enzyme sur l'ADNr

Un des objectifs de l'étude mécanistique de la transcription Pol I que nous avons menée était de déterminer si des propriétés différentes des Pol I Wt et CARA pouvaient expliquer la différence de densité de molécules d'enzyme sur l'ADNr observée dans les deux souches correspondantes. Même si l'extrapolation *in vivo* des données obtenues *in vitro* ne peut être qu'hypothétique, si l'on considère dans un premier temps que les étapes antérieures à l'entrée en élongation processive (initiation, échappement du promoteur) sont également limitantes ,d'un point de vue cinétique, dans les cellules Wt et CARA, on s'attend à ce que la densité d'enzyme sur l'ADNr soit plus importante pour la Pol I la plus lente en élongation (i.e. Pol I CARA). C'est exactement l'inverse qui est observé. Nos données suggèrent donc que l'étape limitante du cycle transcriptionnel est beaucoup plus lente dans les cellules CARA que dans les cellules Wt. Deux hypothèses simples sont donc envisageables :

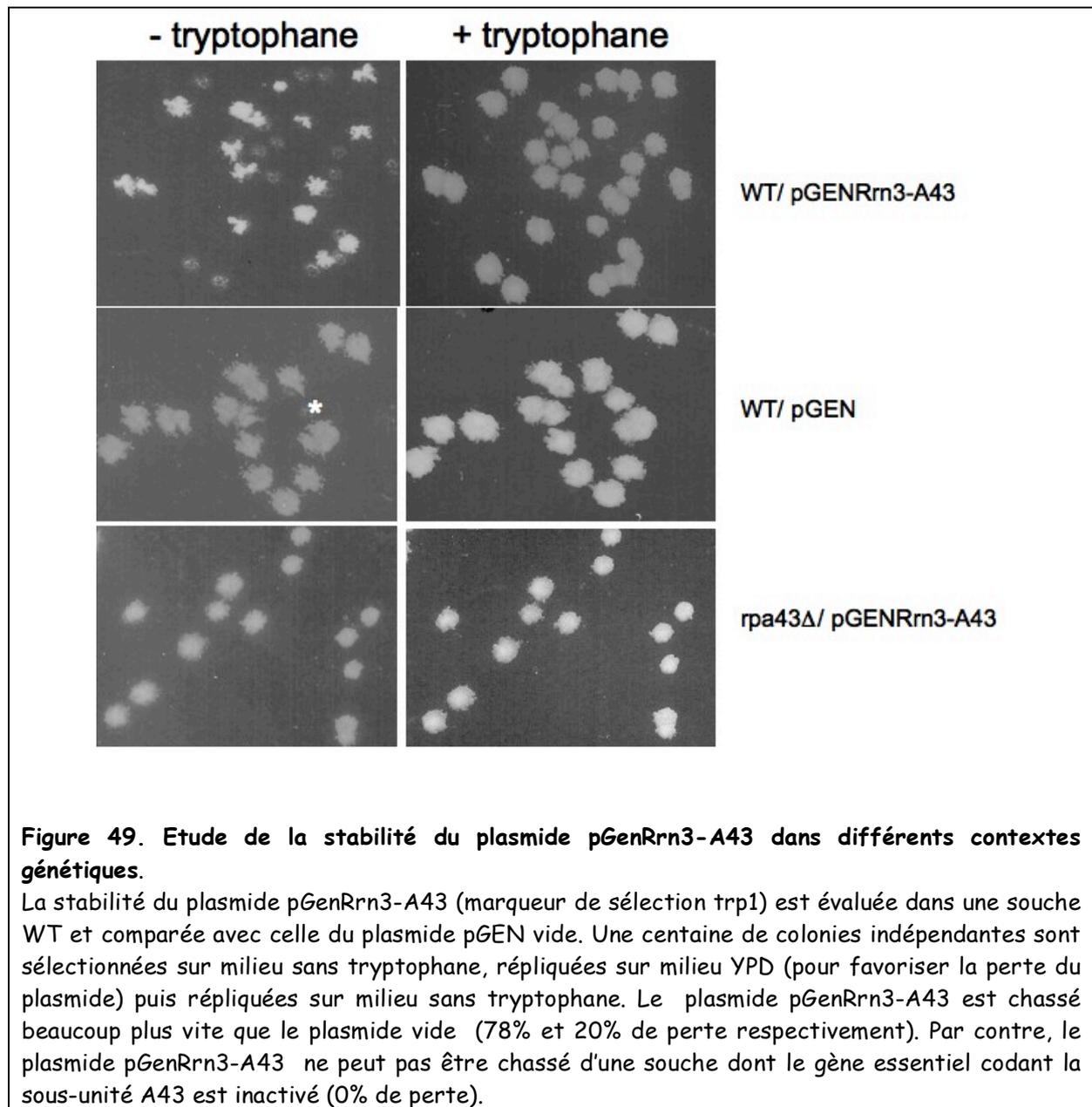
- i) Soit c'est le complexe Pol I-Rrn3 qui est recruté sur le promoteur, et si l'on part du principe que la Pol I CARA a les mêmes propriétés que le complexe Pol I-Rrn3, alors il est probable que c'est l'étape d'échappement du promoteur qui est sensiblement plus lente dans les cellules CARA que dans les cellules Wt*
- ii) Soit la formation du complexe Pol I-Rrn3 n'a lieu qu'après le recrutement de l'enzyme sur le promoteur, et l'on peut imaginer dans ce cas que la Pol I CARA soit moins efficacement recrutée que l'enzyme seule.*

Les données bibliographiques relatives à cette question ne permettent pas de trancher facilement entre ces deux possibilités. Chez la souris, de nombreux résultats obtenus par l'équipe d'I. Grummt (DKFZ, Heildeberg) indiquent que c'est d'abord l'enzyme libre qui est recrutée sur le promoteur de l'ADNr et que l'association de la Pol I avec le

facteur TIF-IA se produit subséquemment. Chez la levure, un seul papier suggère un mécanisme similaire pour la formation du complexe Pol I-Rrn3 (Aprikian et al., 2001), alors que des données collectées par les équipes d'H. Tschochner, et du Pr. Nomura et par notre laboratoire militent pour un recrutement du complexe (et pas de l'enzyme libre). En particulier, et contrairement à ce qui est observé pour le système acellulaire murin, il est impossible de mettre en évidence le recrutement de la Pol I libre sur l'ADNr, et de réaliser une transcription spécifique *in vitro* en présence de Pol I et du facteur Rrn3 non associés. Il est clair que ces dernières observations peuvent être interprétées de multiples façons, mais il est tentant de proposer que le recrutement de la Pol I sur le promoteur de l'ADNr se fait via des mécanismes différents chez la souris et chez la levure. Cette hypothèse pourrait expliquer le caractère létal de l'association de l'enzyme avec la facteur TIF-IA chez la souris, ce complexe covalent étant difficilement (ou n'étant pas) recruté par le complexe de pré-initiation de classe I.

III) Conséquences phénotypiques de l'association covalente du facteur Rrn3 avec la Pol I

Ainsi que nous l'avons précédemment indiqué, la souche CARA ne présente aucun défaut de croissance par rapport à une souche Wt isogénique lorsque les cellules sont cultivées en milieu riche, solide ou liquide (YPD à 30°C), et ce bien que la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 lors de l'entrée en élongation soit un mécanisme conservé de la levure à l'homme. L'expression de la protéine de fusion A43-Rrn3 (voir Figure 49) n'est cependant pas neutre puisque des résultats obtenus récemment par Pierre Thuriaux dans le service montrent que des cellules sauvages transformées avec un plasmide portant le gène exprimant cette protéine de fusion ont tendance à le perdre beaucoup plus rapidement au cours des générations qu'un plasmide contrôle ne portant pas ce gène (Figure 49). Ce résultat démontre donc que l'expression de la protéine A43-Rrn3 présente une certaine toxicité. Dans les cellules CARA, le plasmide portant la protéine de fusion ne peut être éliminé car les deux gènes essentiels codant A43 et Rrn3 sont inactivés.



L'étude mécanistique que nous avons menée nous a permis de mettre en évidence un défaut d'élongation de la transcription de la Pol I CARA. Ce résultat nous a conduit à vouloir tester si la souche CARA était sensible au mycophénolate, une drogue qui affecte les pools des XTP intracellulaires et qui, en particulier, diminue la concentration en GTP. Des souches mutantes de levure affectées dans l'élongation de la transcription sont généralement hypersensibles à cette drogue. Comme on le constate sur la figure 50, tel n'est pas le cas pour la souche CARA qui ne présente aucun phénotype de croissance en présence de différentes concentrations de mycophénolate.

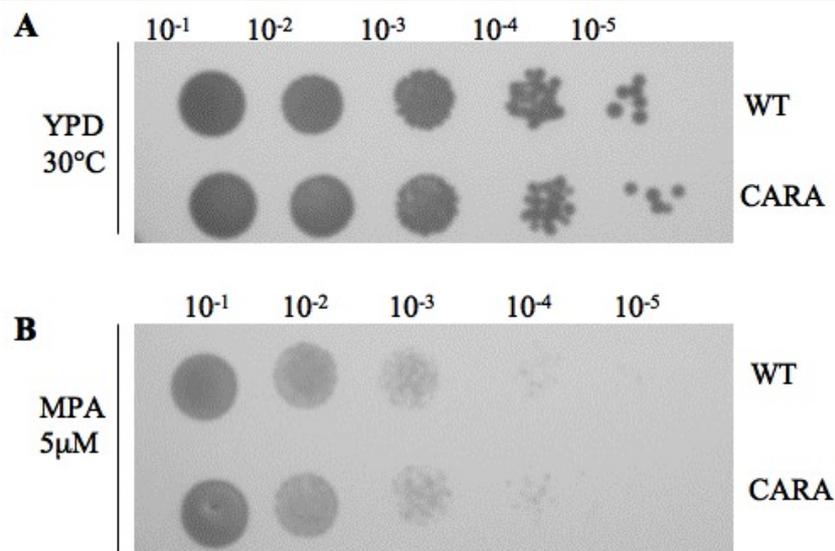


Figure 50. Sensibilité au mycophénolate des souches WT et CARA Les cellules cultivées en milieu riche sont récoltées en phase exponentielle de croissance ($OD_{600}=1$). Des dilutions successives sont réalisées dont une goutte ($3\mu\text{l}$) est déposée à la surface d'un milieu gélosé qui est incubé à 30°C . **(A)** milieu riche YPD. **(B)** milieu SC sans méthionine et en présence de $5\mu\text{M}$ de mycophénolate. Le facteur de dilution est indiqué sur la partie haute de la figure.

Deux types d'hypothèses (non mutuellement exclusives) pourraient expliquer ce résultat :

- i) Soit le défaut de vitesse de synthèse du transcrit observé *in vitro* peut être compensé *in vivo* par des facteurs d'élongation de classe I non présents (ou non fonctionnels) dans le PA600,
- ii) Soit ce défaut concerne une étape de l'élongation qui est peu sensible à la concentration de NTP, par exemple la translocation du site actif. Rappelons à ce propos que pour déterminer la vitesse de disparition du 60 mer (voir paragraphe II-5-2), nous nous étions placés à très faible concentration de GTP (6 nM), et que dans ces conditions, la différence de vitesse de synthèse de la première liaison phosphodiester n'était que d'un facteur 1,5 entre les Pol I CARA et Wt.

Enfin, des données obtenues par Pierre Thuriaux au laboratoire montrent que l'inactivation du gène non essentiel codant la sous-unité A49 de la Pol I est létale dans le contexte génétique de la souche CARA.

La colétalité de la délétion du gène codant A49 et de la mutation présente dans les cellules CARA indique que A49 et la dissociation du complexe Pol I-Rrn3 pourraient être importantes pour une même étape du cycle transcriptionnel. Cette hypothèse est intéressante car une étude récente suggère que la sous-unité A49 est impliquée dans l'étape d'échappement du promoteur (Beckouet et al., 2008). Ce résultat confirmerait donc une des deux hypothèses que nous avons formulées dans le paragraphe II-5-7 pour expliquer les différences de densité de molécules de Pol I sur l'ADNr entre les cellules Wt et CARA, à savoir que c'est l'étape d'échappement du promoteur qui est sensiblement plus lente dans les cellules CARA que dans les cellules Wt.

Perspectives

I) Conséquences de la non dissociation du complexe Pol I-rrn3

I-1) Sur le cycle transcriptionnel de la Pol I (*in vitro*)

Comme nous l'avons déjà mentionné dans ce manuscrit, le complexe Pol I-Rrn3 est la seule forme d'enzyme qui soit compétente pour l'initiation de la transcription (Milkereit and Tschochner, 1998). Lors de l'entrée en phase d'élongation du cycle transcriptionnel le facteur Rrn3 se dissocie de la Pol I *in vivo* et *in vitro* (Aprikian et al., 2001; Bier et al., 2004; Claypool et al., 2004). De plus, il a été montré *in vitro* chez la levure, en utilisant les fractions PA600, que le facteur Rrn3 dissocié lors de l'entrée en étape d'élongation n'est pas capable de se réassocier à une molécule de Pol I libre afin de réinitier un nouveau cycle transcriptionnel (Milkereit and Tschochner, 1998). L'ensemble de ces données a conduit à proposer l'existence d'un cycle régulateur de la transcription Pol I au cours duquel Rrn3 i) s'associe à la Pol I, ce qui permet l'initiation d'un cycle transcriptionnel, ii) se dissocie de l'ADNr lors de l'élongation de la transcription et est inactivé, ce qui l'empêche de se réassocier avec la Pol I, et iii) est réactivé en condition d'activation de la transcription Pol I, ce qui permet la formation d'un nouveau complexe Pol I-Rrn3 et l'initiation d'un nouveau cycle transcriptionnel.

Dans la souche CARA, le facteur Rrn3 est associé de façon stable à la Pol I. Il est donc très probable que dans les cellules CARA, le facteur Rrn3 reste associé à la Pol I pendant la totalité du cycle transcriptionnel, permettant ainsi aux molécules de Pol I CARA de réinitier un nouveau cycle de transcription juste après l'étape de terminaison.

La méthode la plus directe pour déterminer si une polymérase est capable de réinitier consiste à comparer les intensités des signaux obtenus en condition de transcription en cycles multiples *versus* en cycle unique. Afin de réaliser des expériences de transcription *in vitro* en cycle unique, on utilise la propriété des complexes d'élongation à résister à des concentrations en héparine ou en sarkosyl qui dissocient ou empêchent la formation des complexes d'initiation. Ainsi, lorsque la reprise en élongation de complexes ternaires bloqués est réalisée en présence de concentrations d'héparine ou de sarkosyl adéquates, les polymérases finissent de transcrire la matrice sur laquelle elles sont engagées mais

ne peuvent plus réinitier. Cette méthode a déjà été utilisée pour démontrer la capacité de la Pol III à réinitier (Dieci and Sentenac, 1996) figure 51 et l'incapacité de la Pol I WT à réinitier (Milkereit and Tschochner, 1998).

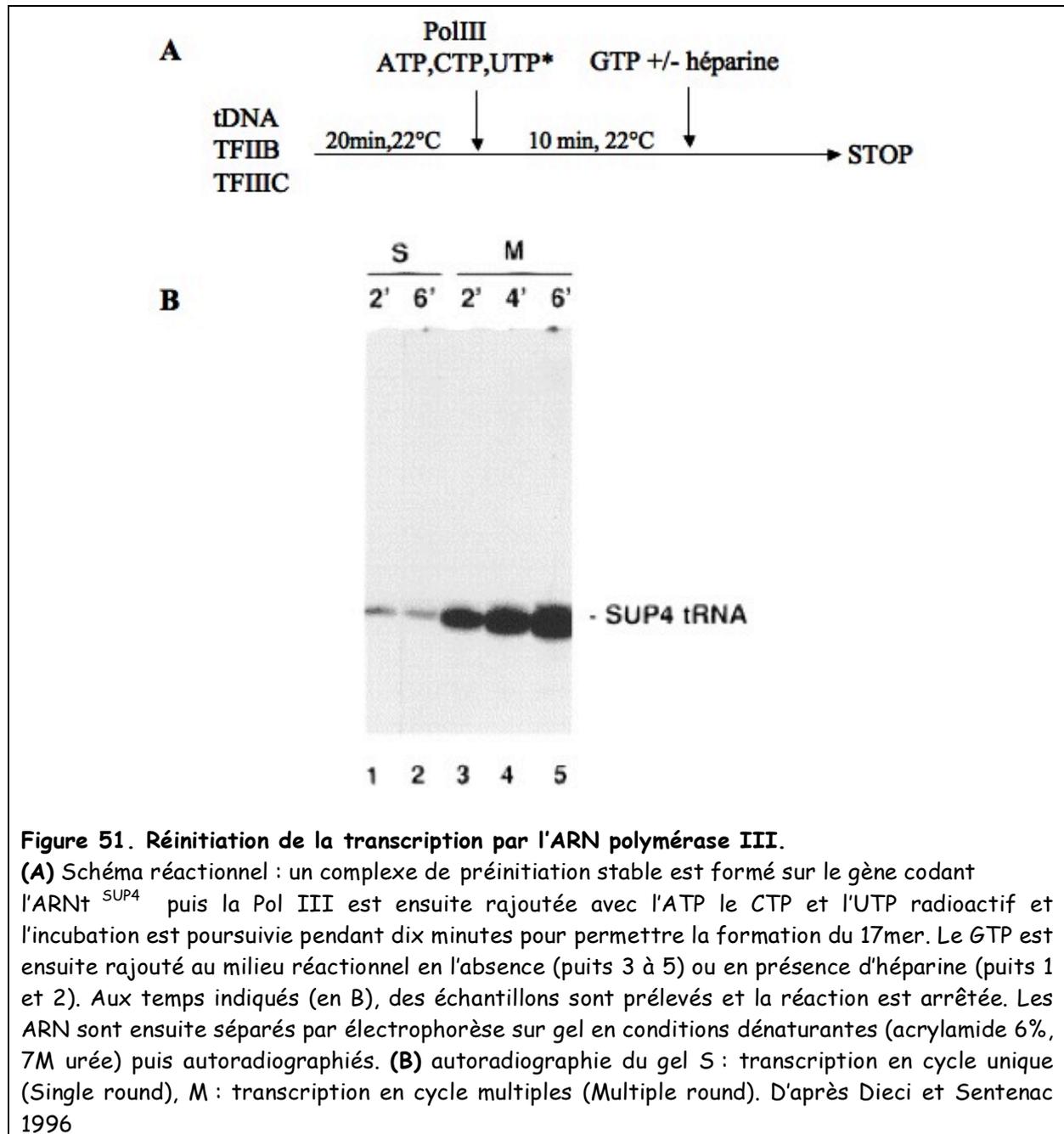


Figure 51. Réinitiation de la transcription par l'ARN polymérase III.

(A) Schéma réactionnel : un complexe de préinitiation stable est formé sur le gène codant l'ARNt^{SUP4} puis la Pol III est ensuite rajoutée avec l'ATP le CTP et l'UTP radioactif et l'incubation est poursuivie pendant dix minutes pour permettre la formation du 17mer. Le GTP est ensuite rajouté au milieu réactionnel en l'absence (puits 3 à 5) ou en présence d'héparine (puits 1 et 2). Aux temps indiqués (en B), des échantillons sont prélevés et la réaction est arrêtée. Les ARN sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (acrylamide 6%, 7M urée) puis autoradiographiés. (B) autoradiographie du gel S : transcription en cycle unique (Single round), M : transcription en cycle multiples (Multiple round). D'après Dieci et Sentenac 1996

Lorsque nous avons voulu étudier l'étape de réinitiation par la Pol I CARA, nous n'avions pas encore construit les matrices contenant une cassette sans G (p22 et p60) qui permettent de bloquer la Pol I en élongation et de pouvoir transcrire en condition de

cycle unique. Nous avons donc utilisé une méthode indirecte. La transcription est réalisée en conditions standards avec la matrice (YepSIRT) et le PA600 WT ou CARA. Les résultats obtenus, (figure 52) montrent que le signal correspondant au transcrit complet obtenu par la transcription du plasmide YepSirt par le PA600 CARA augmente au fur et à mesure de la cinétique. De plus les derniers résultats obtenus en étudiant l'élongation du 60 mer sans préincubation préalable (Résultats partie II-5-6 figure 45) corroborent ce résultat. Pour le PA600 WT, le signal augmente en début de cinétique, mais au bout de 10 minutes nous observons un plateau qui doit correspondre à l'intensité du signal en cycle de transcription unique.

Ce résultat est très préliminaire, mais suggère que la Pol I CARA est capable de réinitier contrairement à la Pol I WT.

Cette étude devrait être poursuivie de façon plus rigoureuse afin de déterminer plus précisément le rôle du facteur Rrn3 dans le cycle de transcription de la Pol I.

Pour cela, il faudra réaliser tout d'abord des expériences de transcription spécifique *in vitro* en cycle multiples et unique en utilisant les matrices p22 et p60 que j'ai construites. Il sera donc nécessaire de déterminer la concentration d'héparine ou de sarkosyl requise pour transcrire en cycle unique. Et si la Pol I CARA est capable de réinitier, il serait intéressant de déterminer par des expériences de « template commitment » si elle réinitie de façon préférentielle sur la même molécule de matrice ou si elle réinitie sur une autre molécule de matrice. Ces expériences consistent à former d'abord des complexes ternaires sur une matrice donnée (p22 ou p60) puis à rajouter en même temps le GTP et une seconde matrice (dont la transcription génère un produit de taille différente). La transcription de cette nouvelle matrice n'est possible que si la Pol I CARA capable de réinitier est dissociée après un cycle de transcription.

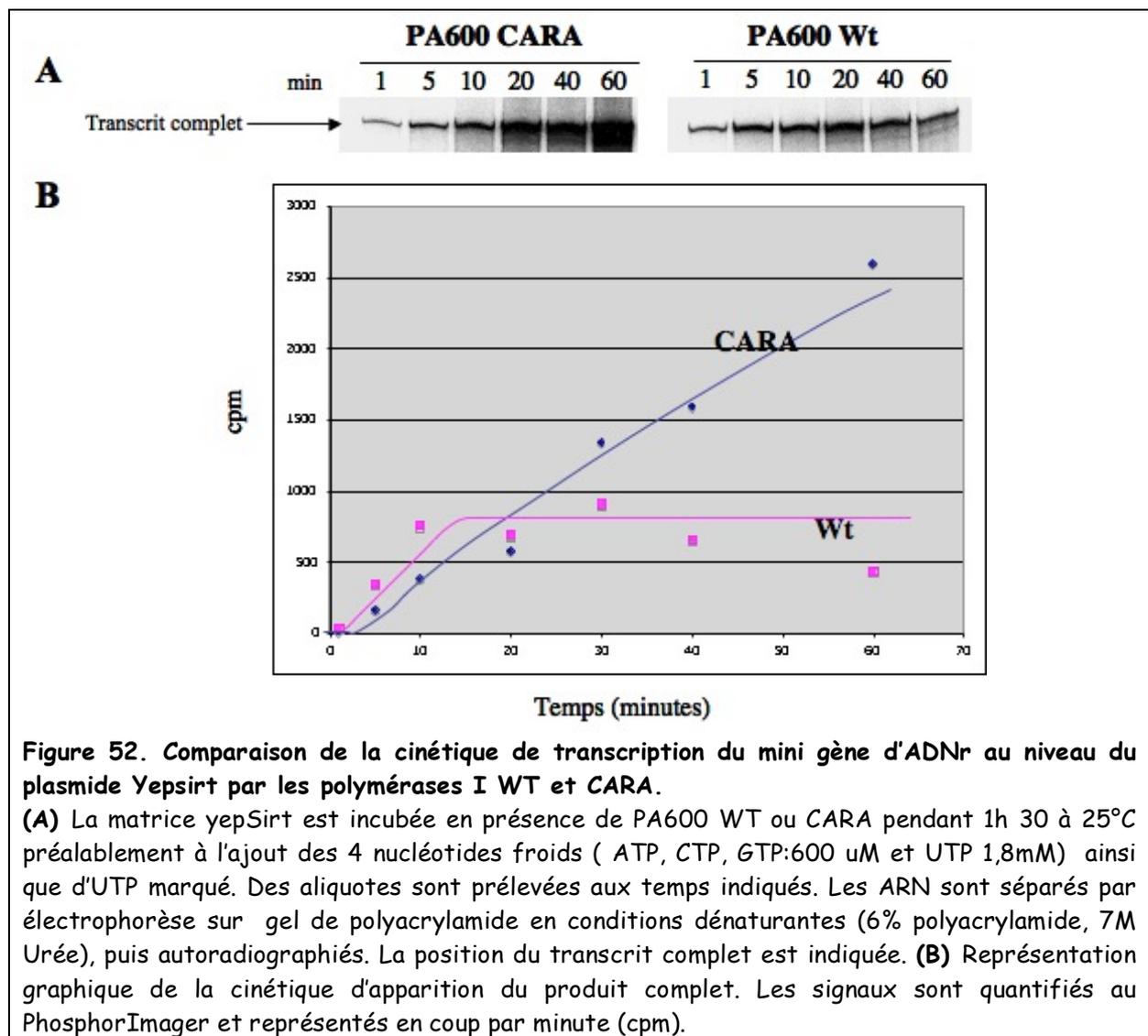


Figure 52. Comparaison de la cinétique de transcription du mini gène d'ADNr au niveau du plasmide Yepsirt par les polymérases I WT et CARA.

(A) La matrice yepSirt est incubée en présence de PA600 WT ou CARA pendant 1h 30 à 25°C préalablement à l'ajout des 4 nucléotides froids (ATP, CTP, GTP:600 uM et UTP 1,8mM) ainsi que d'UTP marqué. Des aliquotes sont prélevées aux temps indiqués. Les ARN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (6% polyacrylamide, 7M Urée), puis autoradiographiés. La position du transcrit complet est indiquée. (B) Représentation graphique de la cinétique d'apparition du produit complet. Les signaux sont quantifiés au PhosphorImager et représentés en coup par minute (cpm).

L'idéal pour l'étude mécanistique de la transcription par Pol I serait de disposer d'un système de transcription efficace constitué de tous les facteurs de transcription purifiés comme pour le système Pol III de levure par exemple. Ce système nous permettra alors d'étudier de nouveaux paramètres tels que le clivage et la fidélité de la Pol I. Il nous permettra surtout de comparer ces paramètres entre la Pol I WT et la Pol I CARA afin de déterminer si la non dissociation du facteur Rrn3 a une influence sur le clivage ou la fidélité de la transcription et ainsi de mieux préciser le rôle de ce facteur dans la transcription par la machinerie de classe I. Il serait également intéressant de comparer la fidélité de la Pol I par rapport à celle de la Pol II et celle de la Pol III.

Ce système sera également très important pour comparer le recrutement de la Pol I Wt et de la Pol I CARA sur le PIC ainsi que l'étape d'échappement du promoteur. En effet,

un défaut de l'une de ces deux étapes du cycle pourrait être à l'origine de la densité moindre de molécules de Pol I observée dans les cellules CARA par rapport aux cellules Wt en l'absence de rapamycine.

Outre l'étude des différentes étapes du cycle transcriptionnel et des propriétés de la Pol I, ce système purifié sera précieux pour préciser le rôle des sous-unités de la Pol I dans l'une des étapes du cycle. Il serait par exemple, intéressant d'étudier le rôle de la sous-unité A49 afin de savoir si elle est vraiment impliquée dans l'étape d'échappement du promoteur comme ceci l'a été suggéré par le laboratoire de Pierre Thuriaux, étant donné que l'inactivation du gène codant cette sous-unité dans les cellules CARA est létale.

I-2) In vivo :

a) Sur l'occupation du 35S par la Pol I

L'étude de l'occupation de l'ADNr 35S par la Pol I dans les cellules WT et CARA par ChIP et par Miller spread a montré que dans les cellules CARA la densité de molécules de Pol I sur l'ADNr est plus faible par rapport aux cellules WT.

Une des raisons qui peut expliquer une telle différence, est un défaut de recrutement de la Pol I par le complexe de préinitiation sur le promoteur dans la souche CARA. Nos résultats de ChiP concernant l'étude de l'occupation du promoteur de l'ADNr révèlent que dans les cellules WT, nous avons une augmentation de 33% de l'occupation du promoteur par le Core Factor et une augmentation de 66% concernant UAF (Upstream Activating Factor). Cependant, comme je l'ai déjà mentionné, ces expériences restent très préliminaires et ont besoin d'être confirmés. Même si comme nous l'avons déjà mentionné (résultats partie I-4-2) ces résultats, en tant que tels, ne peuvent pas expliquer la différence de densité de molécules de Pol I observée entre les cellules CARA et Wt en l'absence de rapamycine.

Il serait également important de déterminer de façon plus fiable la proportion de copies actives par la méthode du pontage au psoralène. Ceci pourrait être réalisable en utilisant de nouvelles sondes s'hybridant sur l'ADNr 35S ou en changeant les conditions électrophorétiques de migration de façon à bien séparer les bandes lentes et rapides et permettre ainsi une quantification plus rigoureuse.

b) Sur la maturation et le clivage du 35S :

La technique du Miller spread permet d'étudier la maturation cotranscriptionnelle de l'ARNr notamment l'assemblage du SSU processome et le clivage au niveau du site A2 conduisant à la séparation des ARNr précurseurs de la grande et de la petite sous unité des ribosomes (Osheim et al., 2004).

Dans les cellules WT, en l'absence de rapamycine, l'assemblage du SSU processome et le clivage sont observés sur les ARNr naissants de la plupart des gènes en cours de transcription.

Après l'ajout de la rapamycine, sur les rares transcrits observés, on note la présence de SSU processome mais le clivage au site A2 n'est pas observé.

L'absence de clivage après quatre heures de traitement à la rapamycine, alors qu'un assemblage du SSU processome est constaté au niveau des rares transcrits présents, peut faire partie d'une stratégie établie par la cellule afin de reprendre rapidement la synthèse de ribosomes une fois que la carence en nutriments est restaurée.

De façon surprenante, dans des conditions normales de croissance, les cellules CARA présentent un assemblage du SSU processome moins efficace que dans les cellules WT et lors du traitement rapamycine, une absence importante de processomes sur les transcrits naissants est constatée. La non-dissociation du facteur Rrn3 dans les cellules CARA pourrait donc entraver l'assemblage du processome. Il a également été démontré que les gènes du régulon RIBI (RIBosome BIogenesis, groupe de gènes impliqués dans les processus d'assemblage, de maturation et de transport des ribosomes) n'étaient pas dérégulés dans les cellules CARA lors d'une cinétique de traitement à la rapamycine, donc ils sont réprimés de la même façon que dans les cellules WT (Laferte et al., 2006), alors que la synthèse d'ARNr continue (au moins pour les premiers temps de la cinétique). Ceci pourrait expliquer le manque de SSU processomes dans les cellules CARA lors du traitement rapamycine, qui serait dû à l'absence ou à la présence en très faible quantité d'un des composants protéiques du processome empêchant l'assemblage efficace du complexe de maturation.

L'étude par Miller spread de la maturation cotranscriptionnelle du 35S révèle donc un assemblage moins efficace du SSU processome dans les cellules CARA que dans les

cellules WT. Cette altération de l'assemblage de la machinerie de maturation devrait se traduire par des défauts de maturation du 35S qui pourraient être révélés par la technique de Northern Blot. Il a déjà été réalisé dans notre laboratoire des expériences de Northern Blot et des expériences de marquage à l'uracile tritiée des ARN de cellules WT et CARA en phase exponentielle de croissance et lors d'un traitement à la rapamycine afin d'étudier les différents intermédiaires de maturation de l'ARNr 35S. Aucune différence de représentation relative de ces intermédiaires n'a été constatée entre les deux souches.

Il serait intéressant d'étudier plus en détails la maturation de l'ARNr par Northern Blot dans les deux souches en utilisant différentes sondes. Une étude récente montre que dans une souche présentant une mutation ponctuelle au niveau de la sous-unité A135 de la Pol I et dans laquelle l'élongation de la transcription est affectée (comme c'est le cas dans la souche CARA), un défaut significatif de la maturation du 35S est observé (Schneider et al., 2007). D'où l'importance d'approfondir l'étude de la maturation du 35S dans la souche CARA afin de vérifier que le défaut d'élongation observé *in vitro* dans cette souche n'a pas d'influence sur l'étape de maturation *in vivo*.

II) Structure du nucléole dans les cellules WT et CARA lors d'un traitement long à la rapamycine

L'étude par immunofluorescence de la localisation de la Pol I dans les cellules WT et CARA lors d'un traitement long à la rapamycine a permis de montrer de façon surprenante cependant, que la localisation cellulaire de la Pol I restait inchangée dans les cellules CARA pour des temps longs de traitement à la rapamycine (2h et 4h,) alors qu'au bout de 4h de traitement, le niveau de transcription Pol I dans les deux souches était comparable. L'analyse de la localisation cellulaire de la protéine Nop1 (impliquée dans les étapes précoces de maturation de l'ARNr 35S) conduit au même résultat : la localisation nucléolaire de Nop1 est conservée dans la souche CARA après 4h de traitement, alors qu'elle est très diffuse dans la souche WT, et ceci dès 20 min d'exposition à la rapamycine.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) nous ont permis de montrer que dans la souche *CARA*, la Pol I restait associée à l'ADNr, même après 4h de traitement à la rapamycine (donc dans des conditions de répression totale de la transcription) alors que dans les cellules WT, une forte diminution de l'occupation de l'ADNr par la Pol I était observée dès 20 min. Nous avons confirmé ces résultats grâce à une collaboration avec le laboratoire d'Ann Beyer dont l'équipe a démontré que la densité de molécules de Pol I sur l'ADNr dans les cellules *CARA* n'était que légèrement modifiée suite à un traitement à la rapamycine contrairement aux cellules WT où une diminution de 80% environ était observée.

Ces données suggèrent donc que contrairement à ce qui était communément admis, le maintien de l'intégrité de la structure du nucléole ne nécessite pas de transcription Pol I active mais seulement la présence de l'enzyme sur l'ADNr.

La démonstration rigoureuse d'un découplage entre l'activité de transcription Pol I et le maintien de l'intégrité de la structure du nucléole nécessite cependant pour être complète l'analyse par microscopie électronique de la structure fine du nucléole dans les cellules *CARA* en présence ou en absence de rapamycine. Cette analyse nous permettra d'étudier la structure des différents compartiments du nucléole à savoir le centre fibrillaire, le composant fibrillaire dense et le composant granulaire et de mieux comprendre la relation existant entre la structure du nucléole et la présence et/ou l'activité de la Pol I.

Il serait également intéressant de déterminer si la fraction de Pol I présente au niveau de l'ADNr au bout de quatre heures de traitement à la rapamycine dans les cellules *CARA* est en pause (comme on pourrait l'imaginer d'après les données de primer extension) ou si ces polymérases sont actives. Nous aimerions donc étudier ce paramètre par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). J'ai déjà construit les souches Wt et *CARA* dans lesquelles j'ai étiqueté la sous-unité de la Pol I A190 par la GFP. Ces souches nous permettront d'étudier les mouvements de la Pol I sur l'ADNr et de déterminer si après quatre heures de traitement à la rapamycine les polymérases présentes sur l'ADNr 35S dans les cellules *CARA* sont toujours actives ou pas.

Matériels et Méthodes

I) Matériel

I-1) Souches et Milieux

I-1-1) Souches :

Fond génétique YPH500

YPH500 : mat a, ade2, ura3-52, trp1 Δ 63, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, lys2-801

Cette souche transformée par le plasmide pGen vide (TRP1,2 μ m) constitue la souche contrôle dans les expériences utilisant la souche CARA et est nommée Wt dans le texte.

CARA : mat a, ade2, ura3-52, leu2 Δ 1, lys2-801, Rrn3 :: HIS5, RPA43 :: KAN, pGEN RPA43-Rrn3 (ampR, Trp1, promoteur PGK1)

NOY1071 mat a, ade2-1, ura3-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11, can1-100, fob1 Δ :: HIS3, le locus RDN1 de cette souche est constitué de 25 copies de ADNr

NOY886 mat α , ade2-1, ura3-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11, can1-100, fob1 Δ :: HIS3, rpa135 Δ :: LEU2, pNOY117(RPA135/pRS314), le locus RDN1 de cette souche est constitué de 40 copies de ADNr

NOY1064 mat a, ade2-1, ura3-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11, can1-100, fob1 Δ :: HIS3, le locus RDN1 de cette souche est constitué de 190 copies de ADNr

Ces trois souches (fournies par le laboratoire du Pr. Nomura) ont été utilisées dans les expériences pour la détermination par Southern blot du nombre de copies d'ADNr pour les souches WT et CARA.

I-1-2) Milieux :

Les souches ont été cultivées en milieu riche YPD. La rapamycine a été ajoutée à la concentration de 0,5 μ g/ml dans l'ensemble des expériences.

Milieu SC (Synthétique complet)

II) Méthodes :

II-1) Étude de l'expression des gènes

II-1-1) Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir de 1.10^8 cellules récoltées en phase exponentielle de croissance. Après lavage des cellules avec 500 μ l de tampon AE (50mM d'acétate de sodium pH5,3 ; 10mM EDTA), les cellules sont resuspendues avec 500 μ l de tampon AE et 50 μ l de SDS 10%. Après addition de 500 μ l de phénol (pH acide, 0,1% 8-hydroxyquinolone) équilibré dans le tampon AE, la suspension est vortexée pendant 1 minute puis incubée à 65°C pendant 4 minutes. Les cellules sont alors congelées rapidement dans un mélange éthanol-carboglance puis sont décongelées à température ambiante. La phase aqueuse est alors récupérée après centrifugation à 13000 g et à température ambiante. Les protéines restantes sont ensuite éliminées de la suspension d'ARN par extraction avec un volume de PCI (Phénol : Chloroforme : Alcool Isoamylique). Les ARN sont alors précipités en présence de 0,1V d'acétate de sodium 3M pH 5,3 et de 2,5V d'éthanol absolu à -80°C pendant au minimum 30 minutes. Les suspensions sont ensuite centrifugées à vitesse maximale à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant est éliminé, le culot d'ARN est alors lavé avec 1ml d'éthanol 80%, puis resuspendu dans 40 μ l d'eau DEPC (DiéEthylPyroCarbonate).

II-1-2) Extension d'amorces

Cette expérience consiste à hybrider les ARN totaux extraits des cellules avec des oligonucléotides spécifiques des ARN 35S et de l'Actine. Les séquences de ces oligonucléotides sont présentées dans la partie « Matériel ».

10 pmol d'oligonucléotides sont marqués radioactivement avec du γ^{32} P- ATP par 20 U de T4 polynucléotide Kinase. Après inactivation de la kinase par incubation à 65°C, les oligonucléotides marqués sont purifiés sur colonne de perméation G25 (Amersham). Pour chaque point des cinétiques effectuées, 0,25pmoles d'oligonucléotides marqués ainsi qu'environ 3 μ g d'ARN totaux (pour les points T0 des cinétiques de traitement à la rapamycine) sont dénaturés par incubation à 85°C pendant 5 minutes. Après ajout de 0,4M de NaCl et de 0,2 μ l de RNasin, le mélange oligonucléotides/ ARN totaux est incubé pendant 1 heure à 40°C. Au cours de cette étape, les oligonucléotides s'hybrident

à l'ARN et vont servir d'amorces à la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc). L'élongation de ces ADNc s'effectue à 42°C après ajout de 10 U de « reverse transcriptase AMV », de 40 U de RNasin et de 0,09mmol de dNTP. Les ADNc sont précipités à l'éthanol 100% (2,5V) en présence d'acétate de sodium (0,1V), puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% contenant 7M d'urée, en tampon TBE. Après un traitement de fixation dans 10% d'acide acétique additionné de 20% d'éthanol, suivi du séchage du gel, les signaux obtenus sont visualisés par autoradiographie (film Biomax MR kodak) et quantifiés grâce au logiciel ImageJ.

II-2) Analyse du génome de la structure et de l'occupation de la chromatine

II-2-1) Southern Blot

Marquage radioactif d'une sonde ADN par amorçage aléatoire (random priming) :

Les sondes radioactives utilisées pour les expériences de Southern blot sont marquées à l'aide du kit « Random Prime labeling » (Stratagene). Ce kit est basé sur le principe du marquage aléatoire de fragments d'ADN. Après dénaturation à 95°C, des hexanucléotides de synthèse vont s'hybrider à l'ADN monocaténaire et servir d'amorce au fragment de Klenow de l'ADN polymérase. Cette dernière synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice grâce à son activité polymérase 5'-3'. La présence de 50 µCi de α-32P dCTP (3000Ci/mmol) dans le milieu réactionnel permet l'obtention de brins néosynthétisés radioactifs. Les nucléotides libres peuvent ensuite être éliminés par filtration sur une colonne de perméation G50 (Amersham). Cette dernière étape permet de réduire le bruit de fond des hybridations de façon conséquente.

Extraction de l'ADN génomique :

Les cellules de levure cultivées en milieu YPD et en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=1$) sont lavées deux fois à l'eau. Les cellules sont reprises dans la solution A (2% triton X100, 1% SDS, NaCl 100 mM, Tris pH8 10mM, EDTA 1mM) et sont cassées en présence de billes de verre et de PCI (Phénol :Chloroforme : Alcool Isoamylique). Après ajout de TE pH8, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et l'ADN est

précipité par de l'éthanol 100%. Le culot d'ADN est ensuite resuspendu dans 50µl de tampon TE pH8 contenant de la RNase 50ug/ml (invitrogen).

Southern blot :

Après digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Après migration, le gel est traité pendant 10 minutes avec de l'HCl 0,25N, placé dans un bain de soude pendant 30 minutes, puis dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5M pH7,5 ; SSC 10X) pour 40 minutes. Les molécules d'ADN sont ensuite transférées par capillarité sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) en présence de SSC 20X. Après pontage aux UV des molécules d'ADN sur la membrane (stratalinker, autocrosslink, 1200 joules), cette dernière est incubée en présence de la solution d'hybridation (0,1% SDS, 1% lait, SSC6X) durant au moins 30 minutes à 65°C. Elle est ensuite incubée avec la solution d'hybridation contenant la sonde marquée radioactivement à 65°C pendant toute la nuit. La membrane est ensuite lavée 2 fois 30 minutes à 55°C puis à 50°C dans le tampon de lavage A (SSC2X; SDS 0,1%) et 2 fois 30 minutes à 50°C dans le tampon de lavage B (SSC0,2X; SDS 0,1%). Les signaux sont ensuite observés et quantifiés après exposition au Typhon (GE Healthcare).

II-2-2) Test de retard au psoralène

Récolte des cellules et pontage covalent *in vivo*

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance (DO=1), puis le pontage est effectué par l'addition de formaldéhyde à la concentration finale de 1%. Après une incubation à température ambiante pendant 20 minutes, le pontage est arrêté par ajout de glycine à une concentration finale de 125mM. Les cellules sont soumises à une agitation à température ambiante pendant 5 minutes, ensuite elles sont récoltées par centrifugation. Les culots cellulaires sont lavés à l'eau puis congelés à -80°C.

Préparation des noyaux et pontage au psoralène

Les culots cellulaires sont lavés à trois reprises par 1ml de tampon A (Tris HCl pH7,4 15mM ; KCl 80 mM, EDTA 2 mM, spermidine 0,5 mM, spermine 0,2 mM) complété par du PMSF et de la benzamidine. Ensuite les cellules reprises dans 350µl de solution A sont lysées au vibrax par ajout de 400 µl de billes de verre. Les lysats obtenus sont isolés des billes, lavés par 1 ml de solution A, centrifugés et les culots sont repris dans 450 µl de tampon Ag (Tris HCl pH7,4 15 mM ; KCl 80 mM, EGTA 0,1 mM, spermidine 0,5 mM, spermine 0,2 mM).

100µl de tampon 2XIRN (Tris HCl pH8 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 0,5 M) sont rajoutés à un aliquot de 100µl de culots repris dans le tampon Ag, puis les 200µl obtenus sont placés sur la glace dans une plaque 24 puits. Après addition de 10µl de triméthylpsoralen (Sigma) à 0,2 mg/ml en éthanol, les cellules sont incubées pendant 5 minutes sur la glace puis irradiées avec une lampe UV (366nm, 10mW/cm²) placée à 2 cm de la plaque. Les étapes d'ajout de psoralène et d'irradiation UV sont répétées 3 fois.

Extraction de l'ADN :

Les noyaux irradiés sont incubés 1h à 37°C en présence de RNase A (20 mg/ml), ensuite ils subissent un traitement à la protéinase K (20 mg/ml) pendant 1h à 56°C en présence de SDS. Afin de réverser le pontage au formaldéhyde, les noyaux sont incubés toute la nuit à 65°C.

L'ADN est extrait avec 1 volume de PCI (Phénol : Chloroforme : Acide isoamylique) et précipité en présence de 2,5 volumes d'éthanol 100%. Le culot est repris dans 50 µl de Tris EDTA.

Southern Blot :

L'ADN génomique est digéré pendant toute la nuit à 37°C par 50 U d'enzyme EcoR I. Les échantillons sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% en absence de bromure d'éthidium à 40V pendant 8h. Le gel est ensuite irradié sur ses deux faces, puis traité en vue d'un transfert par capillarité sur membrane de nylon .

II-2-3) Immunoprécipitation de la chromatine

Pontage covalent *in vivo* :

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance (DO=1), puis le pontage est effectué par l'addition de formaldéhyde à la concentration finale de 1%. Après une incubation à température ambiante pendant 20 minutes, le pontage est arrêté par ajout de glycine à une concentration finale de 125 mM. Les cellules sont soumises à une agitation à température ambiante pendant 5 minutes, puis récoltées par centrifugation. Les culots cellulaires sont lavés dans 50ml de Tris 20mM pH 8 froid puis sont centrifugés 3 minutes à 4000 rpm. Les culots sont ensuite congelés à -80°C.

Préparation de la chromatine :

Après décongélation, les cellules sont reprises dans 5ml de tampon de lyse FA/SDS/PMSF (50 mM Hepes-KOH pH 7,5 ; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Déoxycholate de sodium, 0,1% SDS, PMSF ajouté extemporanément à une concentration finale de 1 mM) puis centrifugées 3 minutes à 4000 rpm. Les culots sont resuspendus dans 1 ml de tampon de lyse, puis transvasés par 500µl dans deux tubes eppendorf de 2ml. 500µl de billes de verre (425-600µm) sont ensuite ajoutés et les cellules sont broyées au vibrax à puissance maximale à 4°C. Pendant le broyage, des tubes Greiner de 12ml sont percés avec une aiguille (0,7X30nm ou 0,5X15nm). Les tubes sont ensuite placés dans des tubes Falcon de 50ml froids.

Une fois le broyage terminé, les échantillons sont transvasés dans les tubes Greiner percés. Les tubes contenant le broyat sont lavés avec 1ml de tampon de lyse FA/SDS/PMSF froid. Les broyats sont isolés des billes par centrifugation 1 minute à 2000 rpm. Les éluats sont ensuite transférés dans des tubes corex 15ml stériles, puis sont centrifugés à 12000rpm à 4°C pendant 20 minutes. Chaque culot est dissous dans 1,6ml de tampon de lyse et transvasé dans un tube eppendorf de 2ml. Ce dernier est ensuite mis sur roue rotative à 4°C pendant une heure. Une centrifugation à 15000rpm est ensuite réalisée pour récolter la chromatine. Les surnageants sont aspirés et les culots sont remis en suspension dans 1,6 ml de tampon de lyse FA/SDS/PMSF. Une incubation des échantillons sur roue rotative à 4°C est réalisée pendant 20 minutes.

Sonication de la chromatine :

Les tubes sont placés dans un mélange eau/glace. La sonde du sonicateur est placée à 3-4mm du fond des tubes. Chaque échantillon est soniqué trois fois pendant 40 secondes à puissance 4, 60% *duty cycle*, et mode *pulsed* (Sonicateur Cell™, Sonics and materials INC, Danbury, Connecticut, USA), avec 20 secondes d'intervalle entre deux sonications, pour générer des fragments d'ADN d'une longueur moyenne de 500 pb. Le mélange est ensuite transféré dans un tube Greiner de 12 ml. 3ml de tampon de lyse sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont ensuite placés sur roue rotative à 4°C pendant 30 minutes. Une centrifugation à 10000 rpm pendant 30 minutes est ensuite réalisée pour rendre soluble la chromatine. La chromatine est aliquotée par 700 µl et congelée à -80°C.

Qualité de la sonication :

Une digestion des protéines par la pronase (12,5 µl de pronase à 20 mg/ml) de 350µl de chromatine est réalisée 1h à 37°C . La réversion du pontage ADN/protéines est obtenue en incubant les échantillons toute la nuit à 65°C. Les extraits sont ensuite incubés 1h à 37°C en présence de RNase A (0,8 µl à 10 mg/ml) afin d'éliminer les ARN. Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés avec le kit PCR purification de Quiagen. L'élution se fait dans 100µl de Tris 10 mM pH8. La taille des fragments d'ADN obtenus après sonication est analysée sur une aliquote de 20 µl par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% TBE.

Immunoprécipitation :

50µl de billes couplées à des anticorps dirigés contre des anticorps de souris ou de lapin sont lavées 3 fois avec 500µl de PBS/BSA 0,1%, puis sont repris dans 100 µl de la même solution. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est alors ajouté afin d'être couplé à l'anticorps déjà présent sur les billes. Ce couplage se fait pendant 30 minutes à 30°C sous une agitation de 1300 rpm. Suite à cette incubation, trois lavages dans 500 µl de PBS/BSA 0,1% sont réalisés. Le dernier lavage se fait 10 minutes à 30°C sous agitation à 1300 rpm. 500µl de chromatine et 50µl de PBS/BSA (10 mg/ml) sont ensuite ajoutés aux billes, puis les mélanges sont incubés à 21°C pendant 2 heures sous agitation

à 1300 rpm. Les billes sont ensuite reprises dans 500 µl de tampon de lyse et transférées dans un tube propre. Trois lavages sont effectués avec 1ml de tampon de lyse dont la concentration en NaCl est ajustée à 500mM. Le dernier lavage se fait à 21°C pendant 20 minutes sous agitation à 1300 rpm. Les échantillons sont ensuite lavés dans 500µl de tampon IP (10 mM Tris pH 8, 250 mM LiCl, 1mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5% déoxycholate de sodium) puis dans 500µl de TE. Les billes sont ensuite remises en suspension dans 125µl de tampon Pronase dilué 5 fois (25mM Tris pH7,5 ; 5mM EDTA, 0,5%SDS) pour l'élution des protéines à 65°C pendant 20 minutes. Afin d'hydrolyser les protéines, 6,25ul de pronase (20mg/ml) et 25µl de tampon pronase (125mM Tris pH7,5 ; 25mM EDTA, 2,5%SDS) sont également ajoutés à 100µl d'extrait brut (Input).

Réversion du pontage ADN- protéines :

Après 1 heure à 37°C, la réversion du pontage ADN-protéines est obtenue en incubant toute la nuit à 65°C. Les extraits sont ensuite incubés 1 heure à 37°C en présence de 0,8µl de RNaseA (10 mg/ml) afin d'éliminer les ARN. Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés avec le KIT PCR purification de Quiagen. L'élution se fait avec 100 µl de Tris 10 mM pH 8. Une seconde élution est ensuite réalisée avec 100 µl de Tris.

PCR en temps réel :

Les fragments d'ADN co-immunoprécipités sont détectés par PCR quantitative en temps réel. Les réactions sont effectuées dans des plaques 96 puits (thermo-Fast 96 Reaction, Abgene) en utilisant SYBR Green Master Mix (Invitrogen) et le programme 35 X 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C sur un appareil ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Chaque PCR est réalisée en duplicata dans un volume final de 25 µl à partir de 5 µl d'ADN purifié (IP ou Input) et 10 pmoles de chaque amorce. Une courbe de dissociation des amplicons est déterminée par augmentation progressive de la température en fin de réaction afin de vérifier la spécificité de chaque amplicon. Afin de calculer l'enrichissement de la protéine d'intérêt, une valeur seuil Tc (threshold cycle) est d'abord déterminée pour chaque PCR. Cette valeur correspond au cycle au cours duquel le signal de fluorescence émanant d'un puits atteint un niveau 10 fois supérieur au signal moyen du bruit de fond mesuré pour l'ensemble des puits.

En se référant à une courbe standard réalisée sur des dilutions en série d'ADN, une quantité relative d'ADN est attribuée à chaque cycle. L'enrichissement d'une protéine correspond donc au pourcentage de la quantité d'ADN co-immunoprécipité (IP) par rapport à la quantité d'extrait brut (Input).

II-2-4) Immunofluorescence

Les cellules provenant de 9 ml de culture sont fixées par ajout de 1 ml de formaldéhyde 37% (Sigma) directement dans le milieu de culture et agitation douce. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000 rpm, 4 minutes et le culot est lavé deux fois avec 1 ml de tampon KP sorbitol (50 mM KPO_4 pH 6,5 ; 0,5 mM $MgCl_2$, 1,2 M sorbitol) 4°C et est repris dans 1ml de tampon KP sorbitol.

La paroi des cellules (150 μ l) est digérée avec 15 μ l de β -mercaptoéthanol et 10 μ l de zymolyase 100T (100 mg/ml) pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées une fois avec 0,5 ml de PBS 1X , 1% fish gélatine (Sigma), deux fois avec 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, 0,1% Triton X-100 , une fois avec 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine et reprises enfin dans 50 μ l de PBS 1X , 1% fish gélatine. L'anticorps primaire dilué 1/100 est ajouté et les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante.

Les cellules sont lavées une fois avec 0,5 ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, deux fois avec 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, 0,1% Triton X-100 , une fois avec 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine et reprises enfin dans 50 μ l de PBS 1X , 1% fish gélatine. L'anticorps secondaire (IgG alexa 594 , ou goat anti mouse FITC dilués 1/100) est ajouté et les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante.

Les cellules sont lavées une fois avec 0,5 ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, deux fois avec 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, 0,1% Triton X-100, et reprises dans 0,5ml de PBS 1X , 1% fish gélatine, 5 μ l de DAPI à 50 μ g/ml. Après incubation pendant deux minutes à température ambiante, les cellules sont lavées par 0,5 ml de PBS 1X , 1% fish gélatine puis sont reprises dans 10 μ l de PBS 1X.

Les cellules sont analysées au microscope à fluorescence.

II-3) Etudes biochimiques

II-3-1) Préparation de la fraction PA600 utilisée dans les tests de transcription spécifique *in vitro*

Préparation du S100 :

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=1$), par centrifugations successives à 5000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du tampon de broyage (150 mM HEPES pH 7,8 ; 60% glycérol, 60 mM $MgCl_2$, 3 mM DTT, 1 mM PMSF, Complete (cocktail d'anti protéases)) à raison de 0,5 ml par gramme de cellules. Le volume de la suspension est alors mesuré, et la concentration en sulfate d'ammonium est ajustée à 400 mM. La suspension cellulaire est alors congelée dans un mélange éthanol-carboglace. Les cellules sont broyées à la presse de Eaton sous une pression de 6 tonnes. L'extrait brut est ensuite centrifugé 20 minutes à 18000 rpm à 4°C dans un rotor 50-2Ti (Beckman). Le surnageant (appelé S100) est récupéré.

Préparation de la fraction K350 :

Le S100 est dialysé pendant 75 minutes contre 2 l de tampon D0 (20 mM HEPES pH 7,8 ; 20% glycérol, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) puis à nouveau pendant la nuit sous agitation légère à 4°C contre 2 l de tampon K90 (90 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7,8 ; 20% glycérol, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF).

Le S100 dialysé est ensuite chromatographié à un débit linéaire de 1ml/min sur une colonne de DEAE-Sepharose (Pharmacia). Le volume de résine est adapté à la quantité de protéines présentes dans l'extrait à raison de 1 ml de résine pour 7,5 mg de protéines. Après lavage avec 10 volumes de tampon K90 à un débit linéaire de 1ml/min, les protéines sont éluées par du tampon K350 (350 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7,8 ; 20% glycérol, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Le volume des fractions récoltées correspond à un vingtième du volume de colonne. Les fractions dont la concentration protéique est supérieure à 1 mg/ml sont rassemblées et constituent la fraction K350.

Préparation de la fraction PA600 :

L'extrait K350 est dialysé de façon extensive contre 2l de tampon PO (20 mM HEPES pH 7,8 ; 20% glycérol, 2 mM MgCl₂, 20 μM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). À l'issue de la dialyse, le boudin de dialyse est retourné plusieurs fois afin de remettre en suspension les protéines qui ont précipité au cours de cette étape. Le dialysat est ensuite centrifugé 30 minutes à 30000 rpm, à 4°C dans un rotor 50-2 Ti (Beckman). Le culot est remis en suspension dans 2 ml de tampon PO, transféré dans un tube siliconé, et centrifugé 20 minutes à 14000 rpm, à 4°C dans un rotor 5804R (Eppendorf). Le culot est finalement resuspendu dans du tampon P600 (600 mM KOAc, 20 mM HEPES pH 7,8 ; 20% glycérol, 2 mM MgCl₂, 20 μM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, Complete EDTA free) à raison de 100 μl de tampon pour 10 mg de protéines présentes dans la fraction K350 avant dialyse.

Les transcrits ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (7M urée) : 6% polyacrylamide pour les transcrits complets ainsi que pour les réactions de reprise de l'élongation, et 15% polyacrylamide pour les 22 et 60 mer.

Les ARN ont été révélés par autoradiographie (film Kodak Biomax MR) et quantifiés par le logiciel ImageJ.

II-3-2) Transcription spécifique *in vitro*

a) Transcription spécifique : transcrit complet

Les réactions de transcription spécifique *in vitro* ont été réalisées dans un volume final de 30 μl contenant : 20 mM Hepes pH 7,8 ; 10 mM MgCl₂, 0,05 mM EDTA, 280 mM KOAc en présence de 200 μM d'ATP, 200 μM de CTP, 200 μM de GTP, 10 μM d'UTP et 8 μCi de α³²P-UTP (800 Ci/mole). 40ng de plasmide YEpSIRT ou 32 ng des plasmides dérivés (P22 et P60 plasmides obtenus par mutagenèse dirigée sur le plasmide YepSirt et qui contiennent donc des cassettes sans G de 22 nucléotides pour l'un et 60 pour l'autre) sont incubés en présence de la fraction PA600.

Après 20 minutes d'incubation à 25°C, la réaction est arrêtée par addition de 200 μl de solution d'arrêt (10 mM Tris-HCl pH 8 , 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0,6% SDS, 0,5

mg/ml protéinase k, 200 µg/ml glycogène) et les échantillons sont incubés 15 minutes à 30°C.

Les ARN précipités à l'éthanol sont centrifugés pendant 30 minutes à 15000 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé, les culots séchés à 95°C pendant 5 minutes et repris dans 15 µl de tampon de dépôt sur gel (90% formamide, TBE 1X). Avant analyse par électrophorèse, les échantillons sont incubés 5 minutes à 95°C.

b) Transcription spécifique : expérience du 22mer ou du 60 mer

La réaction de transcription a été réalisée comme décrit précédemment à l'exception de la composition des mélanges nucléotidiques :

ATP 600 µM, CTP 600 µM et 25 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (800 Ci/mme).

De plus, les matrices ont été incubées 3 heures en présence du PA600 préalablement à l'ajout des nucléotides.

c) Transcription spécifique : expérience de reprise de l'élongation

Après la formation du 22 mer ou du 60 mer, dans un volume final de 300 µl, la réaction de reprise de l'élongation est déclenchée par l'ajout des nucléotides : ATP 600 µM, CTP 600 µM, GTP 600 µM et UTP 1,8 mM. A chaque point de la cinétique de reprise de l'élongation, une fraction de 30 µl est récoltée.

II-4) Études statistiques

Test de Mann-Whitney :

Le test de Mann-Whitney est un test non paramétrique d'identité portant sur deux échantillons indépendants issus de variables numériques ou ordinales. Il utilise non pas les valeurs prises par les observations, mais leurs rangs une fois ces observations réunies dans un même ensemble.

Une fois les valeurs ordonnées, on calcule le nombre U_1 de fois où une valeur du groupe 1 précède une valeur du groupe 2 et le nombre U_2 de fois où un résultat du groupe 2

précède un résultat du groupe 1. La statistique U de Mann-Whitney est le plus petit de ces deux nombres. Plus U est petit plus les groupes sont significativement différents.

A chacune de ces statistiques est associé un test dont l'hypothèse nulle est que les rangs du groupe 1 ne diffèrent pas des rangs du groupe 2. L'hypothèse alternative est que les rangs des deux groupes diffèrent ou que les rangs d'un groupe sont plus grands que ceux de l'autre groupe.

La valeur U calculée est comparée à une valeur critique lue dans une table pour un seuil fixé, et si U est inférieure à cette valeur critique, l'hypothèse nulle est rejetée.

Bibliographie

- Alic, N., Ayoub, N., Landrieux, E., Favry, E., Baudouin-Cornu, P., Riva, M. and Carles, C. (2007) Selectivity and proofreading both contribute significantly to the fidelity of RNA polymerase III transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10400-10405.
- Allmang, C. and Tollervy, D. (1998) The role of the 3' external transcribed spacer in yeast pre-rRNA processing. *J Mol Biol*, **278**, 67-78.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, **12**, 1-11.
- Aprikian, P., Moorefield, B. and Reeder, R.H. (2001) New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol Cell Biol*, **21**, 4847-4855.
- Awrey, D.E., Weilbaecher, R.G., Hemming, S.A., Orlicky, S.M., Kane, C.M. and Edwards, A.M. (1997) Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J Biol Chem*, **272**, 14747-14754.
- Azzam, R., Chen, S.L., Shou, W., Mah, A.S., Alexandru, G., Nasmyth, K., Annan, R.S., Carr, S.A. and Deshaies, R.J. (2004) Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science*, **305**, 516-519.
- Balajee, A.S., May, A., Dianov, G.L., Friedberg, E.C. and Bohr, V.A. (1997) Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4306-4311.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.
- Beckouet, F., Labarre-Mariotte, S., Albert, B., Imazawa, Y., Werner, M., Gadal, O., Nogi, Y. and Thuriaux, P. (2008) Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Mol Cell Biol*, **28**, 1596-1605.
- Bier, M., Fath, S. and Tschochner, H. (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett*, **564**, 41-46.
- Bierhoff, H., Dunder, M., Michels, A.A. and Grummt, I. (2008) Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Mol Cell Biol*, **28**, 4988-4998.
- Biggiogera, M., Fakan, S., Kaufmann, S.H., Black, A., Shaper, J.H. and Busch, H. (1989) Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J Histochem Cytochem*, **37**, 1371-1374.
- Bodem, J., Dobreva, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M. and Grummt, I. (2000) TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep*, **1**, 171-175.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A.I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 574-585.

- Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J.L., Grummt, I. and Egly, J.M. (2002) CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell*, **10**, 819-829.
- Brandenburger, Y., Jenkins, A., Autelitano, D.J. and Hannan, R.D. (2001) Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *Faseb J*, **15**, 2051-2053.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S. and Schreiber, S.L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, **369**, 756-758.
- Budde, A. and Grummt, I. (1999) p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene*, **18**, 1119-1124.
- Cabart, P. and Kalousek, I. (1998) Early gene expression of both RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2 precedes ribosomal RNA synthesis during lymphocyte mitogenic stimulation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **44**, 343-350.
- Catala, M., Tremblay, M., Samson, E., Conconi, A. and Abou Elela, S. (2008) Deletion of Rnt1p alters the proportion of open versus closed rRNA gene repeats in yeast. *Mol Cell Biol*, **28**, 619-629.
- Cavanaugh, A.H., Evans, A. and Rothblum, L.I. (2008) Mammalian Rrn3 is required for the formation of a transcription competent preinitiation complex containing RNA polymerase I. *Gene Expr*, **14**, 131-147.
- Cavanaugh, A.H., Hempel, W.M., Taylor, L.J., Rogalsky, V., Todorov, G. and Rothblum, L.I. (1995) Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by *Rb* gene product. *Nature*, **374**, 177-180.
- Cavanaugh, A.H., Hirschler-Laszkiwicz, I., Hu, Q., Dundr, M., Smink, T., Misteli, T. and Rothblum, L.I. (2002) Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J Biol Chem*, **277**, 27423-27432.
- Chedin, S., Laferte, A., Hoang, T., Lafontaine, D.L., Riva, M. and Carles, C. (2007) Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle*, **6**, 11-15.
- Chédin, S., Ferri, M.L., Peyroche, G., Andrau, J.C., Jourdain, S., Lefebvre, O., Werner, M., Carles, C. and Sentenac, A. (1998) The yeast RNA polymerase III transcription machinery: a paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 381-389.
- Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L. and 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.
- Clemente-Blanco, A., Mayan-Santos, M., Schneider, D.A., Machin, F., Jarmuz, A., Tschochner, H. and Aragon, L. (2009) Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature*, **458**, 219-222.
- Closs, C. and Kempe, P. (1986) [A differential view and validation of the life-satisfaction construct: an analysis of proven procedures and recommendations for a methodologically based approach in measuring the dimensions of this construct]. *Z Gerontol*, **19**, 47-55.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Rothblum, L.I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R. and Fakan, S. (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol*, **113**, 181-187.

- Comai, L. (2004) Mechanism of RNA polymerase I transcription. *Adv Protein Chem*, **67**, 123-155.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T. and Sogo, J.M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.
- Crespo, J.L. and Hall, M.N. (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 579-591, table of contents.
- D'Amours, D., Stegmeier, F. and Amon, A. (2004) Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell*, **117**, 455-469.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2331-2338.
- Denissov, S., van Driel, M., Voit, R., Hekkelman, M., Hulsen, T., Hernandez, N., Grummt, I., Wehrens, R. and Stunnenberg, H. (2007) Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *Embo J*, **26**, 944-954.
- Di Bacco, A. and Gill, G. (2006) SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation. *Cell Cycle*, **5**, 2310-2313.
- Dieci, G. and Sentenac, A. (1996) Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell*, **84**, 245-252.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L., Hunt, D.F. and Baserga, S.J. (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, **417**, 967-970.
- Ducrot, C., Lefebvre, O., Landrieux, E., Guirouilh-Barbat, J., Sentenac, A. and Acker, J. (2006) Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem*, **281**, 11685-11692.
- Dundr, M., Misteli, T. and Olson, M.O. (2000) The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol*, **150**, 433-446.
- El Hage, A., Koper, M., Kufel, J. and Tollervey, D. (2008) Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev*, **22**, 1069-1081.
- Elliott, S.G. and McLaughlin, C.S. (1979) Regulation of RNA synthesis in yeast. III. Synthesis during the cell cycle. *Mol Gen Genet*, **169**, 237-243.
- Erie, D.A., Yager, T.D. and Von Hippel, P.H. (1992) The single-nucleotide addition cycle in transcription: a biophysical and biochemical perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 379-415.
- Fath, S., Milkereit, P., Peyroche, G., Riva, M., Carles, C. and 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.
- Fatyol, K. and Grummt, I. (2008) Proteasomal ATPases are associated with rDNA: the ubiquitin proteasome system plays a direct role in RNA polymerase I transcription. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 850-859.

- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. and Johnston, S.A. (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **7**, 981-991.
- French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M. and 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.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, **313**, 17-42.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C. and Thuriaux, P. (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *Embo J*, **21**, 5498-5507.
- Gautier, T., Robert-Nicoud, M., Guilly, M.N. and Hernandez-Verdun, D. (1992) Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci*, **102 (Pt 4)**, 729-737.
- Gerber, J., Reiter, A., Steinbauer, R., Jakob, S., Kuhn, C.D., Cramer, P., Griesenbeck, J., Milkereit, P. and Tschochner, H. (2008) Site specific phosphorylation of yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*, **36**, 793-802.
- Ghavidel, A. and Schultz, M.C. (2001) TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell*, **106**, 575-584.
- Ginisty, H., Amalric, F. and Bouvet, P. (1998) Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J*, **17**, 1476-1486.
- Gorski, J.J., Pathak, S., Panov, K., Kasciukovic, T., Panova, T., Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *Embo J*, **26**, 1560-1568.
- Gorski, S.A., Snyder, S.K., John, S., Grummt, I. and Misteli, T. (2008) Modulation of RNA polymerase assembly dynamics in transcriptional regulation. *Mol Cell*, **30**, 486-497.
- Grummt, I. (1981) Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell free system that mimics control in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 727-731.
- Grummt, I. (1999) Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **62**, 109-154.
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N. and 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., Smith, V.A. and Grummt, F. (1976) Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell*, **7**, 439-445.
- Haaf, T., Hayman, D.L. and Schmid, M. (1991) Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res*, **193**, 78-86.
- Haltiner, M.M., Smale, S.T. and Tjian, R. (1986) Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol*, **6**, 227-235.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B. and Hannan, R.D. (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is

- mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol*, **23**, 8862-8877.
- Hannan, K.M., Kennedy, B.K., Cavanaugh, A.H., Hannan, R.D., Hirschler-Laszkiewicz, I., Jefferson, L.S. and Rothblum, L.I. (2000) RNA polymerase I transcription in confluent cells: Rb downregulates rDNA transcription during confluence-induced cell cycle arrest. *Oncogene*, **19**, 3487-3497.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998) Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **12**, 357-369.
- Heitman, J., Movva, N.R. and Hall, M.N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, **253**, 905-909.
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M. and Grummt, I. (1998) Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *Embo J*, **17**, 7373-7381.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P. and Gebrane-Younes, J. (2002) Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci*, **115**, 2265-2270.
- Hontz, R.D., French, S.L., Oakes, M.L., Tongaonkar, P., Nomura, M., Beyer, A.L. and Smith, J.S. (2008) Transcription of multiple yeast ribosomal DNA genes requires targeting of UAF to the promoter by Uaf30. *Mol Cell Biol*, **28**, 6709-6719.
- Huang, R., Wu, T., Xu, L., Liu, A., Ji, Y. and Hu, G. (2002) Upstream binding factor up-regulated in hepatocellular carcinoma is related to the survival and cisplatin-sensitivity of cancer cells. *Faseb J*, **16**, 293-301.
- Huang, R.C., Maheshwari, N. and Bonner, J. (1960) Enzymatic synthesis of RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **3**, 689-694.
- Hurwitz, J., Bresler, A. and Diringler, R. (1960) The enzymatic incorporation of ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect on DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 15-19.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J.M. and Grummt, I. (2002) TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell*, **109**, 297-306.
- Jacobson, M.R. and Pederson, T. (1998) Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7981-7986.
- Jansa, P., Burek, C., Sander, E.E. and Grummt, I. (2001) The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*, **29**, 423-429.
- Jantzen, H.M., Chow, A.M., King, D.S. and Tjian, R. (1992) Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSLI to mediate transcription. *Genes & Dev.*, **6**, 1950-1963.
- Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T. and Horiuchi, T. (2006) Condensin loaded onto the replication fork barrier site in the rRNA gene repeats during S phase in a FOB1-dependent fashion to prevent contraction of a long repetitive array in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **26**, 2226-2236.
- Jones, N.C., Rigby, P.W.J. and Ziff, E.B. (1988) Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes & Dev.*, **2**, 267-281.

- Jordan, P., Mannervik, M., Tora, L. and Carmo-Fonseca, M. (1996) In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase when rRNA synthesis is either active or inactive. *J. Cell Biol.*, **133**, 225-234.
- Ju, Q. and Warner, J.R. (1994) Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 151-157.
- Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (2006) Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem Soc Trans*, **34**, 1082-1087.
- Kawauchi, J., Mischo, H., Braglia, P., Rondon, A. and Proudfoot, N.J. (2008) Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev*, **22**, 1082-1092.
- Keener, J., Josaitis, C.A., Dodd, J.A. and 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. and 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. and 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. and 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.
- Knibiehler, B., Mirre, C., Navarro, A. and Rosset, R. (1984) Studies on chromatin organization in a nucleolus without fibrillar centres. Presence of a sub-nucleolar structure in KCo cells of *Drosophila*. *Cell Tissue Res*, **236**, 279-288.
- Knibiehler, B., Mirre, C. and Rosset, R. (1982) Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus without fibrillar centres: the nucleolus in an established *Drosophila* cell line. *J Cell Sci*, **57**, 351-364.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M. and Horiuchi, T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev*, **12**, 3821-3830.
- Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., Greenblatt, J.F. and Shilatifard, A. (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell*, **11**, 721-729.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J.F. (2002) RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*, **22**, 6979-6992.
- Kuhn, A., Vente, A., Doree, M. and Grummt, I. (1998) Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol*, **284**, 1-5.

- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. and 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.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 514-520.
- Lalo, D., Steffan, J.S., Dodd, J.A. and Nomura, M. (1996) RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *J Biol Chem*, **271**, 21062-21067.
- Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M. and Carles, C. (2006) A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *Embo J*, **25**, 118-128.
- Lang, W.H., Morrow, B.E., Ju, Q., Warner, J.R. and Reeder, R.H. (1994) A model for transcription termination by RNA polymerase I. *Cell*, **79**, 527-534.
- Lang, W.H. and Reeder, R.H. (1993) The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 649-658.
- Lang, W.H. and 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., Blank, T.A., Becker, P.B. and Grummt, I. (1997) RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *Embo J*, **16**, 760-768.
- Learned, R.M., Smale, S.T., Haltiner, M.M. and Tjian, R. (1983) Regulation of human ribosomal RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3558-3562.
- Lebedev, A., Scharffetter-Kochanek, K. and Iben, S. (2008) Truncated Cockayne syndrome B protein represses elongation by RNA polymerase I. *J Mol Biol*, **382**, 266-274.
- Lehmann, A.R. (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, **85**, 1101-1111.
- Leung, A.K., Gerlich, D., Miller, G., Lyon, C., Lam, Y.W., Lleres, D., Daigle, N., Zomerdijk, J., Ellenberg, J. and Lamond, A.I. (2004) Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol*, **166**, 787-800.
- Li, Y., Moir, R.D., Sethy-Coraci, I.K., Warner, J.R. and Willis, I.M. (2000) Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 3843-3851.
- Lin, C.W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K. and Reeder, R.H. (1996) A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 6436-6443.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M.N. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, **10**, 457-468.
- Long, E.O. and Dawid, I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, **49**, 727-764.
- Longtine, M.S., McKenzie, A.r., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and

- economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Ludwig, J.R., 2nd, Oliver, S.G. and McLaughlin, C.S. (1977) The effect of amino acids on growth and phosphate metabolism in a prototrophic yeast strain. *Biochem Biophys Res Commun*, **79**, 16-23.
- Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., Bartek, J. and Lukas, J. (2002) Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol*, **4**, 317-322.
- Mason, P.B. and Struhl, K. (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell*, **17**, 831-840.
- Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F. and Yamamoto, M. (2007) Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol*, **27**, 3154-3164.
- Mayer, C., Bierhoff, H. and Grummt, I. (2005) The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev*, **19**, 933-941.
- Mayer, C. and Grummt, I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, **25**, 6384-6391.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. and Grummt, I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*, **18**, 423-434.
- McStay, B., Frazier, M.W. and Reeder, R.H. (1991) xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes & Dev.*, **5**, 1957-1968.
- McStay, B. and Grummt, I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **24**, 131-157.
- Melese, T. and Xue, Z. (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 319-324.
- Merz, K., Hondele, M., Goetze, H., Gmelch, K., Stoeckl, U. and Griesenbeck, J. (2008) Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev*, **22**, 1190-1204.
- Milkereit, P. and Tschochner, H. (1998) A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *EMBO J.*, **17**, 3692-3705.
- Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I. and Zomerdijk, J.C. (2001) hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *Embo J*, **20**, 1373-1382.
- Miller, O.L., Jr. and Beatty, B.R. (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science*, **164**, 955-957.
- Mizuta, K. (1994) [Regulation of ribosome biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **39**, 542-549.

- Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L., Jr., Beyer, A. and 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. and Van Heerikhuizen, H. (1989) Linker scanning of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9661-9678.
- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I. and Voit, R. (2001) Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J*, **20**, 1353-1362.
- Nierras, C.R. and 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.
- Nogi, Y., Vu, L. and Nomura, M. (1991a) An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7026-7030.
- Nogi, Y., Yano, R. and Nomura, M. (1991b) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3962-3966.
- O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J. and 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.
- Oakes, M., Aris, J.P., Brockenbrough, J.S., Wai, H., Vu, L. and Nomura, M. (1998) Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **143**, 23-34.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W. and Nomura, M. (1993) Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2441-2455.
- Oakes, M., Siddiqi, I., Vu, L., Aris, J. and 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., Siddiqi, I., French, S.L., Vu, L., Sato, M., Aris, J.P., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2006) Role of histone deacetylase Rpd3 in regulating rRNA gene transcription and nucleolar structure in yeast. *Mol Cell Biol*, **26**, 3889-3901.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H. and Busch, H. (1985) Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell*, **54**, 123-133.
- Oliver, S.G. (1997) From gene to screen with yeast. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 405-409.
- Oliver, S.G. and McLaughlin, C.S. (1977) The regulation of RNA synthesis in yeast. I: Starvation experiments. *Mol Gen Genet*, **154**, 145-153.
- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J. and Beyer, A.L. (2004) Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **16**, 943-954.
- Panov, K.I., Friedrich, J.K., Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *Embo J*, **25**, 3310-3322.

- Panov, K.I., Friedrich, J.K. and Zomerdijk, J.C. (2001) A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, **21**, 2641-2649.
- Pederson, T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3871-3876.
- Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W. and Shaw, P.J. (2005) Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol Biol Cell*, **16**, 260-269.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. and Riva, M. (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J*, **19**, 5473-5482.
- Powers, T. and Walter, P. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR- signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 987-1000.
- Preiss, T., Baron-Benhamou, J., Ansorge, W. and Hentze, M.W. (2003) Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat Struct Biol*, **10**, 1039-1047.
- Prescott, E.M., Osheim, Y.N., Jones, H.S., Alen, C.M., Roan, J.G., Reeder, R.H., Beyer, A.L. and 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.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M.E. and Bachellerie, J.P. (1991) Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur J Cell Biol*, **56**, 178-186.
- Pyronnet, S. and Sonenberg, N. (2001) Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 13-18.
- 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. and Roan, J.G. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol Cell Biol*, **19**, 7369-7376.
- Reeder, R.H. and Lang, W.H. (1997) Terminating transcription in eukaryotes: lessons learned from RNA polymerase I. *Trends Biochem Sci*, **22**, 473-477.
- Roeder, R.G. and Rutter, W.J. (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, **224**, 234-237.
- Rogers, S.O., Beaulieu, G.C. and Bendich, A.J. (1993) Comparative studies of gene copy number. *Methods Enzymol*, **224**, 243-251.
- Rohde, J.R., Bastidas, R., Puria, R. and Cardenas, M.E. (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **11**, 153-160.
- Rondon, A.G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Barrera, S. and Aguilera, A. (2003) Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. *Embo J*, **22**, 612-620.
- Rosenwald, I.B. (1996) Deregulation of protein synthesis as a mechanism of neoplastic transformation. *Bioessays*, **18**, 243-250.
- Roussel, P., Andre, C., Comai, L. and Hernandez-Verdun, D. (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol*, **133**, 235-246.

- Rudra, D. and Warner, J.R. (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev*, **18**, 2431-2436.
- Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*, **3**, 179-192.
- Rustchenko, E.P., Curran, T.M. and Sherman, F. (1993) Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **175**, 7189-7199.
- Sandmeier, J.J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W.L., Gallo, C.M., Beyer, A.L. and Smith, J.S. (2002) RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *Embo J*, **21**, 4959-4968.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L. and Sabatini, D.M. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, **22**, 159-168.
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. and Hurt, E.C. (1989) A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.*, **8**, 4015-4024.
- Schmelzle, T. and Hall, M.N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, **103**, 253-262.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. and Hall, M.N. (1997) The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell*, **88**, 531-542.
- Schnapp, A. and Grummt, I. (1991) Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24588-24595.
- Schneider, D.A., French, S.L., Osheim, Y.N., Bailey, A.O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J.R., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2006) RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12707-12712.
- Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2007) Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell*, **26**, 217-229.
- Sehgal, S.N., Baker, H. and Vezina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, **28**, 727-732.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G. and Schreiber, S.L. (2000) Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr Biol*, **10**, 1574-1581.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H. and Deshaies, R.J. (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, **97**, 233-244.
- Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. and Roussel, P. (2002) Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol*, **156**, 969-981.

- Sirri, V., Roussel, P. and Hernandez-Verdun, D. (2000) In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol*, **148**, 259-270.
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P. and Hernandez-Verdun, D. (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol*, **129**, 13-31.
- Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and 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.Y. and Moss, T. (2008) The splice variants of UBF differentially regulate RNA polymerase I transcription elongation in response to ERK phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5093-5101.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D.P., Crane-Robinson, C. and Moss, T. (2001a) 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.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and Moss, T. (2001b) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell*, **8**, 1063-1073.
- Steffan, J., Keys, D., Dodd, J. and Nomura, M. (1996) The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor dependent recruitment of core factor. *Genes & Dev.*, **10**, 2551-2563.
- Stolinski, L.A., Eisenmann, D.M. and Arndt, K.M. (1997) Identification of RTF1, a novel gene important for TATA site selection by TATA box-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 4490-4500.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L. and Uhlmann, F. (2004) Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell*, **117**, 471-482.
- Thiry, M. and Lafontaine, D.L. (2005) Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*, **15**, 194-199.
- Thomas, M.J., Platas, A.A. and Hawley, D.K. (1998) Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II. *Cell*, **93**, 627-637.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M. and Hurt, C.E. (1991) The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.*, **10**, 573-583.
- Torres-Rosell, J., Machin, F., Jarmuz, A. and Aragon, L. (2004) Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network. *Cell Cycle*, **3**, 496-502.
- Trumtel, S., Leger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulieres, F. and Gas, N. (2000) Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol Biol Cell*, **11**, 2175-2189.
- Tsang, C.K., Bertram, P.G., Ai, W., Drenan, R. and 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. and Zheng, X.F. (2007) TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle*, **6**, 25-29.
- Tschochner, H. and Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, **13**, 255-263.
- Tschochner, H. and Milkereit, P. (1997) RNA polymerase I from *S. cerevisiae* depends on an additional factor to release terminated transcripts from the template. *FEBS Lett*, **410**, 461-466.
- Vogelauer, M., Cioci, F. and 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.
- Voit, R., Schafer, K. and Grummt, I. (1997) Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 4230-4237.
- Wai, H., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K., Kobayashi, T., Horiuchi, T. and Nomura, M. (2001) Yeast RNA polymerase I enhancer is dispensable for transcription of the chromosomal rRNA gene and cell growth, and its apparent transcription enhancement from ectopic promoters requires Fob1 protein. *Mol Cell Biol*, **21**, 5541-5553.
- Waldron, C. (1977) Synthesis of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast during a nutritional shift-up. *J. General Microbiology*, **98**, 215-221.
- Waldron, C. and Lacroute, F. (1975) Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J. Bacteriol.*, **122**, 855-865.
- Walter, P. and Johnson, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 87-119.
- Weiss, S. and Gladstone, L. (1959) A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *JACS*, **81**, 4118-4119.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, **135**, 635-648.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, **124**, 471-484.
- Xie, W. and Rothblum, L.I. (1992) Domains of the rat rDNA promoter must be aligned stereospecifically. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1266-1275.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J.A. and Nomura, M. (1996) RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *Embo J*, **15**, 3964-3973.
- Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I. and Zhou, Y. (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell*, **27**, 585-595.
- Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U. and Grummt, I. (2002) Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep*, **3**, 1082-1087.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**, 883-896.

- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J. and Schultz, M.C. (1998) Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **18**, 4463-4470.
- Zhai, W. and Comai, L. (2000) Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, **20**, 5930-5938.
- Zhang, Y., Sikes, M.L., Beyer, A.L. and Schneider, D.A. (2009) The Paf1 complex is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2153-2158.
- Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M. and Grummt, I. (2003) ERK-Dependent Phosphorylation of the Transcription Initiation Factor TIF-IA Is Required for RNA Polymerase I Transcription and Cell Growth. *Mol Cell*, **11**, 405-413.
- Zhong, S., Zhang, C. and Johnson, D.L. (2004) Epidermal growth factor enhances cellular TATA binding protein levels and induces RNA polymerase I- and III-dependent gene activity. *Mol Cell Biol*, **24**, 5119-5129.

Annexes:

Etude de la fidélité de l'ARN polymérase la Pol III

Parallèlement à l'étude mécanistique de la transcription Pol I, j'ai participé durant ma thèse au projet d'un chercheur post-doctoral, N. Alic, qui s'intéressait aux mécanismes de la fidélité transcriptionnelle de la Pol III. Comme mentionné dans l'introduction, cette ARN polymérase synthétise des petits ARN stables et non traduits, dont les ARN de transfert (ARNt) ou l'ARNr 5S. En plus de la Pol III, les facteurs de transcription TFIIIB et TFIIIC sont indispensables pour transcrire spécifiquement les gènes d'ARNt (Kassavetis and Geiduschek, 2006).

La transcription des gènes d'ARNt a été reconstituée *in vitro* chez la levure à partir des complexes TFIIIB et TFIIIC recombinants et d'ARN Pol III purifiée (Ducrot et al., 2006)

Les ARN polymérases ne sont pas aussi fidèles que les ADN polymérases. Les erreurs lors de la transcription sont toutefois moins délétères que celles qui ont lieu lors de la réplication du fait de la transmission de l'ADN à la descendance. La fréquence d'incorporation d'un nucléotide incorrect lors de la transcription est estimée à 10^{-3} et 10^{-5} pour l'ARN polymérase bactérienne (Erie et al., 1992), alors qu'elle n'est que de 10^{-6} à 10^{-9} lors de la réplication. Les mécanismes par lesquels les ADN polymérases assurent la fidélité de la réplication sont bien caractérisés : ces enzymes sont hautement sélectives lors du choix du nucléotide correct, l'utilisant 10^3 à 10^6 fois plus efficacement qu'un nucléotide incorrect. De plus, l'activité exonucléase 3'-5' des ADN polymérases leur permet de corriger les erreurs commises lors de la réplication.

Les études relatives à la fidélité des ARN polymérases sont moins nombreuses. Chez les eucaryotes, seule la fidélité de la Pol II a été étudiée en détail: cette étude a permis de déterminer *in vitro* la sélectivité de l'enzyme pour le nucléotide correct et de mettre en avant le rôle clé du facteur de clivage TFIIIS dans la fidélité de la Pol II (Thomas et al., 1998). L'activité de clivage des ARN au sein des complexes ternaires d'élongation est conservée dans les 3 règnes du vivant (procaryotes, archées, eucaryotes). Bien que catalysée par le site actif des ARN polymérases, Cette activité n'est pas la réaction inverse de la synthèse des liaisons phosphodiesters. C'est une activité endonucléasique

qui ne peut s'exprimer qu'au sein des complexes ternaires et qui nécessite dans la plupart des cas un facteur exogène (facteur de clivage, TFIIS dans le cas de la Pol II). En résumé, cette activité est importante pour cliver un transcrit dont l'extrémité 3' est désengagée du site actif lors d'un arrêt accidentel du complexe d'élongation. Le clivage de l'ARN génère une nouvelle extrémité 3' correctement positionnée dans le site actif. Sans cette réaction, les complexes ternaires bloqués sont incompetents pour reprendre la transcription.

Le rôle potentiel de l'activité de clivage des ARN polymérases dans la fidélité de la transcription est évidemment à rapprocher de la fonction de l'activité exonucléasique des ADN polymérases dans la fidélité de la réplication.

Contrairement à ce qui est observé pour la plupart des ARN polymérases, l'activité de clivage de la Pol III est intrinsèque à l'enzyme et implique la sous-unité C11 (Chédin et al., 1998). Le rôle de cette petite sous-unité essentielle est en fait complexe. Il a été montré au laboratoire qu'outre son implication dans le clivage de l'ARN au sein des complexes ternaires, la sous-unité C11 était requise pour la réinitiation facilitée de la Pol III et ce de façon clivage-indépendante (Landrieux et al., 2006).

A) Etude de la fidélité de l'ARN polymérase III

Le projet de Nazif Alic visait à caractériser les mécanismes moléculaires contrôlant la fidélité de la transcription Pol III. Pour ce faire, il a comparé l'incorporation d'un nucléotide mésapparié par la Pol III Wt et par la Pol III Δ (une forme incomplète d'enzyme dépourvue des sous-unités C11, C37 et C53 ne possédant plus d'activité intrinsèque de clivage et qui peut être obtenue par purification de la Pol III à partir de mutants). Le système de transcription spécifique *in vitro* utilisé au laboratoire comprend les facteurs TFIIIB et TFIIIC recombinants, et la Pol III purifiée. La matrice utilisée dans ces tests est le gène codant l'ARNtSup4. En résumé, ce gène est préincubé pendant 20 minutes à 25°C en présence des facteurs TFIIIB et TFIIIC, et une quantité limitante de Pol III est ajoutée pendant 20 minutes pour former le complexe

de préinitiation. Enfin, l'addition des nucléotides permet le démarrage de la transcription.

Il est important de noter que la séquence codante Wt de la matrice Sup4 ne comporte pas de G dans les 17 premiers nucléotides. Ainsi, quand la transcription est réalisée en l'absence de GTP, les complexes ternaires dans lesquels ADN, ARN néosynthétisés et Pol III sont associés de façon stable sont arrêtés en position +17 mais restent compétents pour la reprise de l'élongation si le GTP est ajouté au milieu réactionnel. En l'absence de GTP, la Pol III Δ incorpore un nucléotide mésapparié en position +18 (préférentiellement un A à la place d'un G) qu'elle est évidemment incapable de cliver.

Pour les expériences de clivage, les complexes ternaires bloqués à +17 sont purifiés par chromatographie de perméation sur gel, puis sont incubés en l'absence de nucléotides dans un tampon contenant du MgCl₂ à 8mM.

Grâce à des expériences de reconstitution *in vitro* de la Pol III Δ avec des sous unités C37, C53, C11 Wt ou mutante (incapable de restaurer l'activité de clivage), nous avons pu déterminer les constantes de vitesse apparentes d'incorporation de nucléotides corrects ou incorrects après un nucléotide mésapparié ou correctement apparié. Les vitesses de clivage de ces nucléotides ont également été déterminées.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication jointe en annexe 2. En résumé, nous avons démontré que la Pol III incorporait un nucléotide correct environ mille fois plus efficacement qu'un nucléotide incorrect, et que le clivage d'un nucléotide mésapparié était 8 fois plus rapide que le clivage d'un nucléotide apparié. Contrairement à ce qui est observé pour la Pol II, l'addition par la Pol III d'un nucléotide correct après un mésappariement constitue l'étape cinétiquement la plus lente lors de la synthèse de transcrits contenant une seule erreur. Enfin, grâce à des modélisations *in silico*, nous avons pu établir qu'*in vitro*, l'activité de sélectivité des nucléotides et l'activité de clivage de l'ARN contribuaient de façon équivalente à la fidélité de la transcription Pol III.

