

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI[®]



Université d'Ottawa • University of Ottawa

**Identification d'une interaction protéique spécifique à une séquence conservée dans
la région 3' non-traduite de l'ARN messenger de prostaglandine endoperoxide H
synthase-1**

par

Maryse Duquette

Cette thèse est soumise en conformité aux exigences requises pour l'obtention du titre de
Maître *es* Science

Département de biochimie, microbiologie et immunologie
Université d'Ottawa

© 2002 Maryse Duquette



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

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

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

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

0-612-72759-9

RÉSUMÉ

Identification d'une interaction protéique spécifique à une séquence conservée dans la région 3' non-traduite de l'ARN messager de prostaglandine endoperoxyde H synthase-1

Maryse Duquette

Département de biochimie, microbiologie et immunologie,

Université d'Ottawa

L'enzyme prostaglandine endoperoxyde H synthase-1 (PGHS-1) est très abondante dans les plaquettes où elle catalyse l'étape limitante dans la formation du thromboxane A₂ (TxA₂), une substance agrégatoire et vasoconstrictive. Cependant, dans les cellules desquelles dérivent les plaquettes, les mégacaryocytes, l'enzyme est quasi absente bien que son ARN messager (ARNm) soit présent. En effet, lorsque les cellules MEG-01 sont récoltées après 1 et 4 jours d'exposition au TPA pour stimuler leur différenciation en plaquettes, les niveaux d'ARNm de PGHS-1 sont élevés dans les deux extraits, tandis que l'enzyme n'est détectée qu'après 4 jours. Nous avons émis l'hypothèse qu'une interaction ARN-protéine(s) dans la région 3' non-traduite (R3'NT) de l'ARNm *PGHS-1*, pourrait expliquer le délai observé entre les accumulations d'ARNm et de protéine PGHS-1. Les séquences de la R3'NT de l'ARNm *PGHS-1* de quatre espèces mammifères ont été comparées, ce qui a permis l'identification d'un segment de 20 nucléotides (nts) parfaitement conservé. Cette séquence a été utilisée comme sonde d'ARN dans des études de retardement sur gels. Les extraits cytoplasmiques de MEG-01 traitées avec le TPA pour 1 jour, mais non pour 4 jours, contiennent des facteurs protéiques fixant la séquence de 20 nts, et la spécificité de cette interaction a été démontrée par l'utilisation d'une sonde antisens. De plus, en introduisant des mutations dans la séquence de 20 nts, nous avons montré que cette interaction spécifique impliquait des résidus uridines. Par ailleurs, le fractionnement sur sucrose de l'ARN total isolé des MEG-01 traitées pour 1 jour a montré que l'ARNm *PGHS-1* semblait lié aux ribosomes, indiquant une activité traductionnelle potentielle. Pourtant aucune protéine n'est détectée par immunobuvardage Western dans ces cellules et ce, même en présence de différents inhibiteurs des systèmes protéolytiques intracellulaires. Ces observations suggèrent que les niveaux de protéine PGHS-1 sont régulés traductionnellement, et qu'un retard dans la synthèse protéique plutôt qu'une dégradation de la protéine nouvellement synthétisée, pourrait expliquer le délai observé entre les accumulations d'ARNm et de protéines dans les cellules MEG-01 en différenciation. Nous proposons un modèle dans lequel la fixation du complexe protéique à l'élément de 20 nts, présent dans la R3'NT de *PGHS-1*, pourrait réguler de façon négative la synthèse de la protéine PGHS-1, alors que l'abolition de l'interaction permettrait la traduction et l'accumulation de la protéine PGHS-1.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier très sincèrement mon superviseur, Dr. Odette Laneuville, pour m'avoir donné l'opportunité d'acquérir une bonne formation durant ces deux années, de m'avoir confié un projet de maîtrise original et stimulant et de m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce travail. Cette recherche a été rendue possible grâce au soutien financier du CIHR (Canadian Institutes of Health Research), fonds de recherche remis au Dr. Laneuville, et du FCAR (Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche), bourse qui m'a été offerte durant mes deux années d'études à la maîtrise.

Mon plus grand remerciement est destiné à Sébastien, pour tous ses conseils et ses encouragements tout au long des années. J'aimerais également remercier ma famille, mes parents et mes soeurs, pour leur présence et leur soutien malgré l'éloignement des deux dernières années. Enfin, merci à tous ceux que mon passage à l'Université d'Ottawa m'a permis de rencontrer, avec qui les conversations ont été très constructives et desquelles une nouvelle amitié s'est nouée, et durera au-delà de mon séjour ici.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTES DES ABBRÉVIATIONS	x
1. INTRODUCTION	
1.1 Problématique et objectif général	1
1.2 La voie des PGHS et son importance physiologique	2
1.3 Purification de la protéine PGHS-1 et ses propriétés	6
1.4 Clonage et caractérisation du gène <i>PGHS-1</i>	12
1.5 Régulation de l'expression du gène <i>PGHS-1</i>	16
1.6 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique	18
-Stabilité de l'ARNm	18
-Localisation de l'ARNm	23
-Efficacité traductionnelle de l'ARNm	26
1.7 Mégacaryocytes et modèle expérimental	30
1.8 Résumé, hypothèse et objectifs spécifiques	33
2. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	
2.1 Culture cellulaire et traitement au TPA	37
2.2 Analyse d'ARN par hybridation Northern	37
2.2.1 Isolation de l'ARN total	37
2.2.2 Résolution sur gel et transfert	38
2.2.3 Hybridation et détection	38
2.3 Analyse protéique	39
2.3.1 Isolation des protéines	39
2.3.2 Immunobuvardage Western	39
2.3.3 Coloration à l'argent	40

2.4	Mesure de l'activité enzymatique	41
2.5	Analyse d'interactions ARN-protéines	42
2.5.1	Préparation des extraits cellulaires	42
2.5.2	Plasmides et transcription <i>in vitro</i> des sondes d'ARN	43
2.5.3	Études de retardement sur gels avec sonde d'ARN (ARN-EMSA)	48
2.5.4	Isolation et analyse sur gels dénaturants du complexe ARN protéines spécifique	49
2.6	Analyse de l'attachement polysomale	50
2.6.1	Extraction et fractionnement de l'ARN total	50
2.6.2	Buvar dage, hybridation et détection	51
2.7	Analyse de l'inhibition des systèmes protéolytiques	51
3.	RÉSULTATS	
3.1	Délai dans l'augmentation des niveaux de protéine PGHS-1 dans les MEG-01 stimulées au TPA	53
3.2	Identification d'une séquence conservée dans la R3'NT de <i>PGHS-1</i>	55
3.3	Identification d'interactions dépendantes de la durée d'exposition au TPA impliquant la séquence conservée de <i>PGHS-1</i> et des extraits cellulaires de MEG-01	62
3.4	Confirmation de la nature ARN-protéines des complexes observés	67
3.5	Identification d'un complexe sensible au TPA dont la formation est dépendante de la présence de la sonde sens	69
3.6	Spécificité de la séquence conservée de 20 nts	72
3.7	Identification de nucléotides importants dans la formation du complexe ARN-protéine(s) spécifique	76
3.8	Caractérisation des protéines cytoplasmiques fixées à la séquence conservée de <i>PGHS-1</i>	82
3.9	L'ARNm de PGHS-1 est associé avec les ribosomes après 1 jr de TPA	86
3.10	La protéine PGHS-1 n'est pas dégradée par les systèmes de protéo- lyse intracellulaire après 1 jr de TPA	90

4.	DISCUSSION	
4.1	Profil d'expression du gène <i>PGHS-1</i> et régulation post-transcriptionnelle	93
4.2	Interaction spécifique ARN-protéines dans la R3'NT de l'ARNm <i>PGHS-1</i>	96
	- Séquence d'ARNm: élément- <i>cis</i>	97
	- Protéines interagissant avec l'ARNm: éléments- <i>trans</i>	100
4.3	Rôles possibles d'une interaction spécifique ARN-protéines dans la régulation post-transcriptionnelle du gène <i>PGHS-1</i>	105
4.4	Perspectives et pharmacologie	116
	RÉFÉRENCES	118
	ANNEXE I: Alignement des séquences de la R3'NT de PGHS-1	134
	CURRICULUM VITAE	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Séquences des oligonucléotides sens et antisens utilisés comme matrice pour la transcription <i>in vitro</i> des sondes d'ARN correspondant à la séquence conservée de 20 nts présente dans la R3'NT de PGHS-1	45

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Voie de biosynthèse cellulaire des prostanoïdes	4
1.2	Structure de la protéine oPGHS-1	8
1.3	Structure du gène <i>hPGHS-1</i>	14
1.4	Régulation post-transcriptionnelle des ARNm médiée par les RNT	19
1.5	Rôle de la R3'NT dans la régulation de la stabilité des ARNm	21
1.6	Rôle de la R3'NT dans la régulation de la localisation et du transport des ARNm	24
1.7	Rôle de la R3'NT dans la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm	27
1.8	Représentation schématique du profil d'expression de l'ARNm et de la protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01 stimulées au TPA	34
2.1	Stratégie de clonage de la séquence de PGHS-1 conservée dans le vecteur d'expression pGEM-3Z	44
3.1	Niveaux d'ARNm, de protéine et d'activité de l'enzyme PGHS-1 après stimulation au TPA	54
3.2	Identification d'une séquence de 20 nts parfaitement conservée dans la R3'NT de <i>PGHS-1</i> de 4 espèces mammifères	57
3.3	Structure secondaire de l'ARNm <i>PGHS-1</i> de 4 espèces mammifères	58
3.4	Études de retardement sur gels avec la sonde sens, en présence d'extraits cytoplasmiques ou nucléaires et de concentrations croissantes d'héparine	63
3.5	Analyse du contenu protéique des extraits cellulaires utilisés dans les études de retardement sur gels	66
3.6	Les complexes observés sont constitués d'ARN et de protéines isolées des MEG-01	68
3.7	Comparaison des complexes formés avec les sondes sens et antisens	71
3.8	Études de retardement sur gels avec la sonde antisens transcrite par l'ARN polymérase T7	74
3.9	Spécificité de la séquence 20-nt dans la formation du complexe C	75

3.10	ARN-EMSA en présence d'un excès de sonde sens froide	78
3.11	Les résidus uridine de la séquence 20-nt sont importants dans la formation du complexe spécifique	79
3.12	Des mutations dans la séquence 20-nt affectent la formation du complexe spécifique	81
3.13	Résolution des réactions d'ARN-EMSA sur gels d'électrophorèse dénaturants	83
3.14	Caractérisation des protéines cytoplasmiques de MEG-01 fixant directement la séquence conservée de <i>PGHS-1</i>	85
3.15	Attachement des polysomes à l'ARNm <i>PGHS-1</i>	88
3.16	Effets de l'inhibition des systèmes protéolytiques sur les niveaux de protéine PGHS-1	91
4.1	Modèle de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène <i>PGHS-1</i> dans les MEG-01 stimulées au TPA	106

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

15-LOX: 15-lipoxygénase
A: Adénosine
aa: Acide aminé
AA: Acide arachidonique
ADN: Acide déoxyribonucléique
ADNc: Acide déoxyribonucléique complémentaire
APP: Amyloid precursor protein
ARE: AU-rich element
ARN: Acide ribonucléique
ARN-EMSA: Étude de retardement sur gel avec sonde d'ARN
ARNhn: Acide ribonucléique hétérogène nucléaire
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ARNr: Acide ribonucléique ribosomal
ARNt: Acide ribonucléique de transfert
ATCC: American type culture collection
ATP: Adénosine triphosphate
AUBF: AU-rich element binding protein
 β ARB: β -adrenergic receptor mRNA-binding protein
BB: Bleu de bromophénol
Bcd: Bicoïd
BSA: Bovine serum albumine
COX-1: Cyclooxygénase-1
COX-2: Cyclooxygénase-2
CPM: Compte par minute
CS-RBD: Consensus sequence-RNA binding domain
CTP: Cytidine triphosphate
dATP: deoxyadenosine triphosphate
db: double brin
DEPC: Diethylpyrocarbonate
DMS: Demarcation membrane system
DMSO: Dimethylsulphoxide
dsRBD: double stranded RNA binding domain
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ethylenediamine tetraacetate
EGF: Epidermal growth factor

eIF: Facteur d'initiation eucaryotique
 ELAV: Embryonic lethal abnormal vision
 GM-CSF: Granulocyte/macrophage colony-stimulating-factor
 GTP: Guanosine triphosphate
 Hb: Hunchback
 HEPES: 4-(2-Hydroxy-ethyl)-piperazine-1-ethane-sulfonic acid
 HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid
 hPGHS-1: Prostaglandine endoperoxide H synthase-1 humaine
 hPGHS-2: Prostaglandine endoperoxide H synthase-2 humaine
 HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells
 IRE: Iron response element
 IRES: Internal ribosome entry segment
 kb: Kilobase
 kDa: Kilodalton
 KH: K-homology domain
 LOX: Lipoxygénase
 MBD: Membrane binding domain
 MEG-01: Lignée cellulaire mégacaryoblastique humaine
 MOPS: 3-Morpholino-propane-sulfonic acid
 NAC: Nascent-polypeptide-associated complex
 Nos: Nanos
 NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drug
 NTP: Nucléoside triphosphate
 oPGHS-1: Prostaglandine endoperoxide H synthase-1 ovine
 PABP: Poly A binding protein
 PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
 PAM : Peptidylglycine α -amidating monooxygénase
 PBS: Phosphate-buffered saline
 PDGF2: Platelet-derived growth factor 2
 piARNm: Protéine interagissant avec l'ARNm
 piARNm-PGHS-1: Protéine interagissant avec l'ARNm de PGHS-1
 PGD₂: Prostaglandine D₂
 PGE₂: Prostaglandine E₂
 PGF_{2 α} : Prostaglandine F_{2 α}
 PGG₂: Prostaglandine G₂
 PGH₂: Prostaglandine H₂
 PGHS-1: Prostaglandine endoperoxide H synthase-1

PGHS-2: Prostaglandine endoperoxide H synthase-2
PGI₂: Prostaglandine I₂
PMSF: Phenyl-methylsulfonyl fluoride
Prm-1: Spermatid-specific protamine-1
PTH: Hormone parathyroïdienne
R2: Ribonucleotide reductase R2
R3'NT: Région 3' non-traduite
R5'NT: Région 5' non-traduite
RE: Réticulum endoplasmique
RRM: RNA-recognition motif
RNP: Ribonucléoprotéine
RNPhn: Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire
RNPm: Ribonucléoprotéine messenger
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS: Sodium dodecylsulphate
SDS-PAGE: Sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis
snRNP: small nuclear RNP
Spnr: Spermatid perinuclear RNA-binding protein
SSC: Standard saline citrate
Std: Standard
TBE: Tris/acide borique/EDTA
TBS: Tris buffer solution
TGF-β1: Transforming growth factor-beta 1
TNF-α: Tumor necrosis factor-alpha
TPA: 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TxA₂: Thromboxane A₂
TxB₂: Thromboxane B₂
U: Uridine
URBP: U-rich binding protein
UTP: Uridine triphosphate
UV: Ultra-violet
XC: Xylène cyanol

1. INTRODUCTION

1.1 Problématique et objectif général

Il existe deux isoformes PGHS, PGHS-1 et PGHS-2, aussi connues sous le nom de cyclooxygénase-1 et -2 (COX-1 et COX-2) (13;14). Bien qu'elles catalysent la même réaction: la synthèse de PGH_2 , chacune d'elle semble participer à des fonctions physiologiques distinctes (15), et leur principale différence réside dans la régulation de leur expression. Alors que PGHS-1 est exprimée dans la plupart des tissus de façon constitutive, PGHS-2, absente dans les tissus non stimulés, peut être rapidement induite en réponse à des stimuli inflammatoires (9;16). La littérature la décrit donc comme étant la forme inductible (PGHS-2) par opposition à la première isoforme identifiée historiquement, la forme constitutive (PGHS-1) (16). L'importance des enzymes PGHS a été mise à jour par l'utilisation des NSAID (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*), drogues telles que l'Aspirin, l'Advil et le Celebrex. Les NSAID sont largement utilisées dans le traitement de la douleur et de la fièvre, composantes de l'inflammation. Cependant, l'utilisation des NSAID dans le traitement de l'arthrite ou des maladies inflammatoires chroniques entraîne souvent des effets secondaires (ulcères, complications gastro-intestinales) attribués à l'inhibition de l'isoforme PGHS-1 (4). Paradoxalement, il a été montré que l'Aspirin diminuait l'incidence des maladies cardiovasculaires associées à des fonctions hyperplaquettaires (5;6). En effet, à faible dose, l'Aspirin inhibe sélectivement et de façon irréversible l'enzyme PGHS-1 présente dans les plaquettes. Cette inhibition diminue la production de prostaglandine H_2 (PGH_2), le substrat de l'enzyme thromboxane synthase qui produit le thromboxane A_2 (TxA_2), principale prostanoïde produite par les plaquettes et favorisant leur agrégation

(1;6-8). Les plaquettes ne possédant pas de noyau et se renouvelant à tous les 7-10 jours, lorsque l'enzyme PGHS-1 est inhibée par l'Aspirin de façon irréversible, aucune activité PGHS-1 n'est produite jusqu'à la régénération de nouvelles plaquettes (6). Ceci suggère que PGHS-1 a un rôle prédominant dans les maladies cardiovasculaires, d'où l'importance de comprendre la régulation du gène *PGHS-1*. Par ailleurs, les plaquettes sont l'une des plus riches sources de PGHS-1 dans le corps, elles représentent donc un système approprié pour étudier l'expression de ce gène (9).

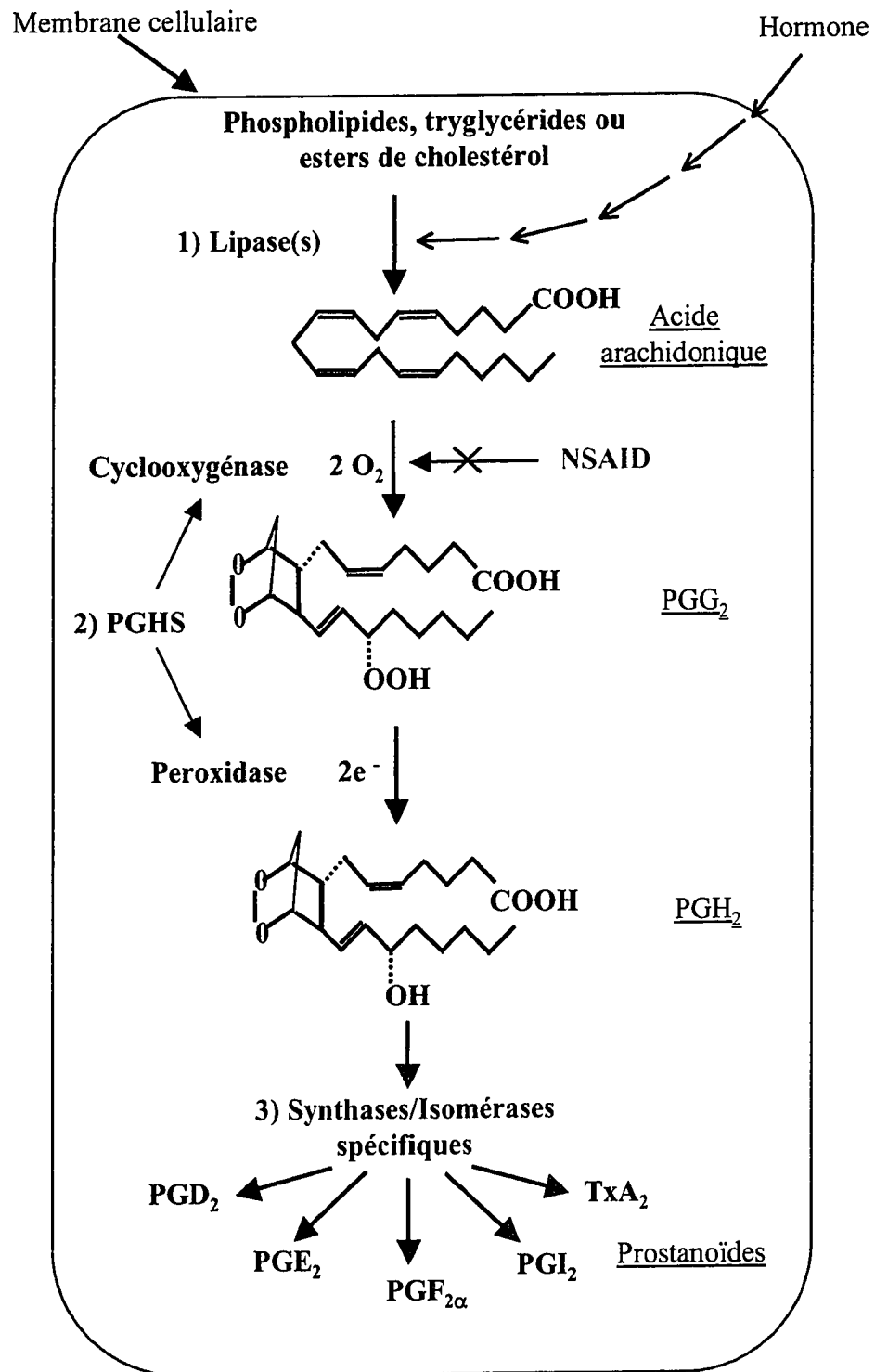
Notre recherche vise à déterminer les mécanismes par lesquels l'expression de *PGHS-1* est régulée dans les plaquettes. Cependant, étant donné que les plaquettes sont des cellules anucléées, leur contenu protéique est le résultat de l'expression génique dans les cellules précurseurs, les mégacaryocytes (10). Comme modèle d'étude de l'expression du gène *PGHS-1*, la lignée cellulaire mégacaryoblastique, MEG-01, stimulée à se différencier en plaquettes par le TPA, est utilisée (11). Notre modèle d'étude *in vitro*, nous a permis d'observer des profils d'induction de l'ARNm et de la protéine PGHS-1, espacés dans le temps; l'augmentation de la protéine étant retardée malgré l'augmentation rapide des niveaux d'ARNm *PGHS-1*(12). Afin de mieux comprendre le patron d'expression du gène *PGHS-1* dans notre modèle *in vitro*, l'objectif général de mon projet fut de tenter d'expliquer le délai observé dans l'accumulation de la protéine PGHS-1.

1.2 La voie des PGHS et son importance physiologique

La voie enzymatique des prostaglandine endoperoxyde H synthases-1 et 2 (PGHS-1 et -2) mène à la formation des prostaglandines et des thromboxanes, des dérivés

d'acide gras *bis*-oxygénés faisant partie de la famille des éicosanoïdes (1). Les prostaglandines et les thromboxanes, collectivement connus sous le nom de *c*, sont des hormones autocrines et paracrines qui régulent un large éventail de fonctions et qui sont capables d'exercer leurs effets physiologiques à de très faibles concentrations (1). La cascade enzymatique menant à la formation des prostanoïdes est divisée en trois étapes, dont la deuxième, l'étape limitante, est catalysée par l'enzyme PGHS (9;17) (Fig. 1.1). Le principal précurseur des prostanoïdes est l'acide arachidonique (AA) ou acide éicosatétraénoïque (20:4 ω -6), un acide gras tétra-insaturé de 20 carbones, membre de la classe des acides gras essentiels oméga-6 et dérivé de l'acide linoléique (18). Les PGHS sont influencées par les concentrations d'AA disponibles; de fortes concentrations (>25 μ M) d'AA vont favoriser la synthèse de prostanoïdes via PGHS-1, tandis que la régulation allostérique négative de PGHS-1 permet à PGHS-2 d'agir à de faibles concentrations d'AA (<1 μ M), indépendamment de la présence de PGHS-1 dans la cellule (9;19;20). L'AA étant stocké parmi les phospholipides membranaires, la première étape de la cascade menant à la formation des prostanoïdes, est l'hydrolyse de l'AA par différentes phospholipases en réponse à un signal hormonal. Une fois libéré, l'AA est rapidement métabolisé par la double action d'une des isoformes de PGHS: une activité cyclooxygénase responsable de la *bis*-oxygénation de l'AA menant à la formation de l'intermédiaire prostaglandine G₂ (PGG₂), puis une activité peroxidase qui réduit le PGG₂ en PGH₂ (1). En compétitionnant avec le substrat AA pour l'accès au site catalytique cyclooxygénase, les NSAID inhibent la synthèse des prostanoïdes en inactivant l'enzyme PGHS (2;3;35;36). Ces drogues sont capables d'inhiber efficace-

Figure 1.1: **Voie de biosynthèse cellulaire des prostanoïdes.** Cette cascade se divise en trois étapes principales: 1) La libération de l'AA par des phospholipases; 2) La transformation de l'AA en PGG_2 puis en PGH_2 par la double activité des PGHS; 3) La conversion par différentes synthases ou isomérases du PGH_2 en une variété de prostanoïdes. (Adaptée de Smith, WL, 1992 (17)).



ment, selon des profils pharmacologiques variés, les deux isoformes de l'enzyme PGHS (34). La dernière étape de la cascade de l'AA est la conversion du PGH_2 en prostanoïdes biologiquement actives par un ensemble de synthases et d'isomérases. Le type de prostanoïde qu'une cellule produit dépend de la synthase/isomérase qu'elle contient, par conséquent, une cellule donnée synthétise majoritairement un type de prostanoïde. Les plus importants prostanoïdes sont les PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 et le TxA_2 (1).

La variété de prostanoïdes obtenue ainsi que leur large distribution dans le corps humain, font de ces métabolites des médiateurs impliqués dans une panoplie de fonctions. Brièvement, la PGD_2 est la principale prostaglandine produite durant la réponse inflammatoire dans la peau (21) et est aussi la majeure prostaglandine produite par les mastocytes (22;23). PGD_2 est également synthétisée par les plaquettes en faible quantité et peut inhiber leur agrégation (24). PGE_2 , pour sa part, a un rôle important dans la régulation des fonctions rénales. Elle est produite par les cellules des tubules collecteurs et les cellules mésangiales qui produisent également la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (25-27). La PGE_2 et la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sont aussi formées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et sont impliquées dans la cyto-protection de la muqueuse gastrique (28), ainsi que dans les fonctions reproductives chez la femme (eg: ovulation, parturition) (29). Par ailleurs, PGHS-1 est l'isoforme prédominante qui produit la PGE_2 dans les poumons (30). La PGI_2 , ou prostacycline, est synthétisée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les cellules des muscles lisses. Elle agit comme substance vasodilatatrice et inhibitrice de l'agrégation des plaquettes et participe aussi à la cyto-protection de la muqueuse gastrique (31;32). En opposition à la PGI_2 , le TxA_2 est un

vasoconstricteur et un agent thrombogénique, synthétisé principalement par les plaquettes, les poumons et les macrophages (1;8;33).

1.3 Purification de la protéine PGHS-1 et ses propriétés

La première isoforme de PGHS fut purifiée en 1976 à partir de glandes vésiculaires bovines (13). Après la découverte d'une seconde isoforme, 15 ans plus tard, on nomma la première isoforme isolée PGHS-1, afin de la distinguer de l'isoforme nouvellement caractérisée, PGHS-2.

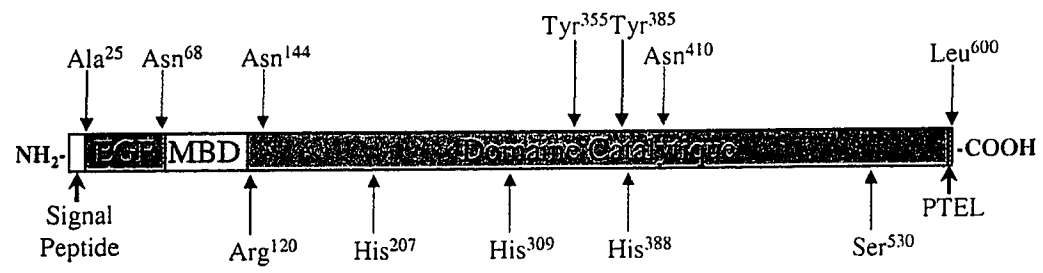
La région codante de *PGHS-1* donne naissance à une protéine de 600 résidus chez le mouton, ce nombre varie de 1 ou 2 résidus selon l'espèce; 599 aa et 602 aa pour l'enzyme humaine et murine, respectivement. Toutefois, toutes les formes matures de la protéine PGHS-1 contiennent 576 aa après élimination du peptide signal qui varie de 23-26 aa, selon l'espèce (37-39). Les structures primaires de la protéine PGHS-1 humaine (hPGHS-1), ovine et murine montrent ~90% d'identité entre elles (37-39). Basé sur la séquence d'aa, le poids moléculaire prédit de la protéine mature serait autour de 65.6 kDa (40). Pourtant, cette enzyme a un poids moléculaire apparent de 70 kDa et migre en une bande unique sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (41). Cette différence est attribuable au fait que l'enzyme PGHS-1 est une glycoprotéine N-glycosylée dont les oligosaccharides sont riches en mannoses (1x Man₇[NacGln]₂ et 2x Man₉[NacGln]₂) (42). Au total, quatre séquences consensus pour la N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été localisées dans la séquence d'aa de PGHS-1 ovine (oPGHS-1) aux positions Asn⁶⁸, Asn¹⁰⁴, Asn¹⁴⁴ et Asn⁴¹⁰ (37;40;43) qui sont conservées chez l'homme (38) et la souris (39). Alors que le site consensus Asn¹⁰⁴ n'est pas glycosylé

(44), il semblerait que la glycosylation sur les résidus Asn⁶⁸, Asn¹⁴⁴ et Asn⁴¹⁰ soit requise pour le bon repliement de la protéine. Par contre, une fois la conformation native atteinte, la glycosylation de ces trois résidus ne serait pas essentielle pour le maintien de l'activité enzymatique de PGHS-1 (44). La localisation de ces sites de glycosylation et de d'autres acides aminés importants est indiquée sur le schéma de la figure 1.2A. L'enzyme PGHS-1 possède aussi la séquence S/PTEL à son extrémité C-terminale, un motif analogue à KDEL, qui permet la rétention de cette protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) (45). En effet, il a été montré que PGHS-1 était localisée sur la surface luminale du RE. Dans certains types de cellules, elle semble également présente sur la surface luminale de l'enveloppe nucléaire, contiguë au RE, et ce, autant dans la membrane interne qu'externe. Elle est cependant absente de la membrane plasmique (46;47;48;49).

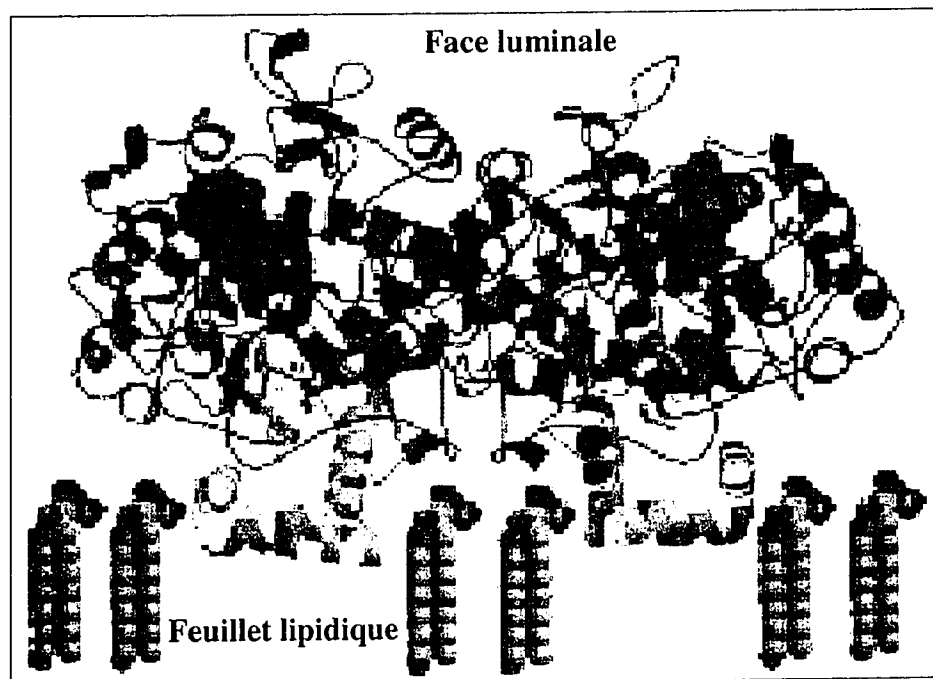
Bien avant la détermination de la structure en trois dimensions de PGHS-1 par cristallographie, l'utilisation de détergents, nécessaire pour extraire la protéine des membranes, avait suggéré que cette protéine faisait partie de la classe des protéines membranaires intégrées (41), mais les efforts pour identifier des domaines transmembranaires n'avaient pas donné de résultats convaincants (40;43). De plus, des expériences de clivages protéolytiques sur des préparations membranaires de PGHS-1 avaient indiqué que l'enzyme n'était pas simplement ancrée flexiblement à la membrane puisque les fragments libérés par protéolyse étaient inactifs (50). Ces observations furent conciliées grâce à l'obtention de la structure en trois dimensions de l'enzyme oPGHS-1, par cristallographie (50). Comme montré à la figure 1.2B, la protéine PGHS-1 est caractérisée par une structure globulaire et compacte dépourvue de régions trans-

Figure 1.2: **Structure de la protéine oPGHS-1.** **A)** Position des trois domaines de la oPGHS-1 par rapport aux extrémités N- et C-terminales et localisations de différents acides aminés importants, tels que ceux impliqués dans la catalyse (voir texte pour détails). **B)** Diagramme d'un homodimère de oPGHS-1 représenté avec la drogue flurbiprofène (jaune) liée dans le site actif cyclooxygénase. L'homodimère est ancré dans un seul feuillet de la bicouche lipidique sur la surface luminale. Le domaine EGF est en vert; le domaine de liaison membranaire (MBD) est montré en orange; les domaines catalytiques peroxidase et cyclooxygénase, en bleu. Le groupement hème est montré en rouge. (Schéma adapté de Smith WL, 2000 (9)).

A)



B)



membranaires distinctes et présentant un mécanisme d'attachement à la membrane assez particulier. Les auteurs ont proposé un modèle d'interaction avec la membrane dans lequel l'enzyme s'associerait à un seul feuillet de la bicouche lipidique au moyen d'un domaine de liaison à la membrane MBD (*Membrane Binding Domain*). En effet, les surfaces hydrophobiques des hélices amphipatiques (A, B, C et le début de D) du domaine MBD forme une zone hydrophobique qui permet d'ancrer la protéine dans la membrane. Cependant cette surface d'interaction n'est pas assez profonde pour s'étendre au-delà du premier feuillet de la bicouche lipidique, par conséquent la protéine PGHS-1 est considérée comme une protéine membranaire monotopique (50-52). Une autre observation de l'étude cristallographique est que la protéine PGHS-1 est un homodimère structurel où les deux monomères sont grandement en contact l'un avec l'autre (50). La dimérité fonctionnelle a aussi été démontré par la suite (53), mais les chercheurs ne s'expliquent toujours pas pourquoi cette dimérisation est nécessaire dans la catalyse, et si elle est présente *in vivo*.

Chaque monomère est formé de trois domaines distincts: le domaine EGF (*Epidermal Growth Factor*), le domaine MBD et le domaine catalytique (Fig. 1.2). Les résidus de l'extrémité N-terminale, forme un petit domaine compact possédant 3 ponts disulfures, désigné sous le nom de domaine EGF (en vert) à cause de sa ressemblance avec la structure du facteur de croissance épidermal. Ce module est rattaché au corps de l'enzyme par un autre pont disulfure et forme l'interface entre les deux monomères de PGHS-1. Le domaine de liaison à la membrane (en orange), MBD, dont la séquence d'une cinquantaine d'aa suit celle du domaine EGF, est constitué de quatre hélices- α (A, B, C, et D) courtes, consécutives et fortement amphipatiques, dont la dernière, l'hélice

D, converge vers le domaine catalytique de l'enzyme. Les résidus hydrophobiques et aromatiques émanant vers l'extérieur des hélices, loin de la surface hydrophilique du domaine catalytique, forment ainsi la zone hydrophobique qui interagit avec un seul feuillet de la bicouche lipidique. Sur leur côté opposé, les hélices ont quelques résidus chargés qui sont bien positionnés pour interagir avec les têtes polaires des phospholipides (50). Finalement, le large domaine catalytique (en bleu) qui possède une structure globulaire, forme le plus gros des trois domaines (environ 460 aa) à l'extrémité C-terminale de PGHS-1 (50). Étant donné la surface polaire du domaine catalytique, il est probablement extérieur à la membrane, tout comme les trois sites de glycosylation (44;50). L'analyse de sa structure permet de distinguer deux lobes formés de plusieurs hélices, un petit et un large, à l'interface desquels le site actif peroxidase est situé. Ce site actif contient le groupement hème (en rouge) localisé près de la surface protéique et qui lui transfère les deux électrons nécessaires à son activité. Le site cyclooxygénase se distingue par un long et étroit tunnel hydrophobique qui s'étend du domaine MBD vers le centre du monomère, de sorte que le substrat hydrophobique, l'AA, libéré de la membrane, n'est jamais exposé à un environnement hydrophile. Le site actif cyclooxygénase est ainsi directement accessible de l'intérieur de la bicouche, malgré qu'il soit situé à l'extérieur de la membrane (50). Comme établi par cristallographie, les deux réactions catalysées par l'enzyme PGHS-1 ont lieu dans des sites distincts, mais structurellement et fonctionnellement interconnectés. Pour que la réaction de cyclooxygénase ait lieu, il faut que le groupement hème dans le site peroxidase subisse une oxydation de deux électrons, elle est donc peroxide-dépendante (54). Pour sa part, l'activité peroxidase peut opérer de façon indépendante de l'activité cyclooxygénase, tel

que lors d'une inhibition par les NSAID (55). L'activité peroxidase a donc deux fonctions dans la synthèse des prostanoïdes: réduire le PGG₂ en PGH₂ et activer la réaction cyclooxygénase (56;57).

Des études ont permis d'identifier les résidus impliqués dans la réaction de catalyse de oPGHS-1 (Fig. 1.2A), tels que les trois résidus His³⁸⁸, His³⁰⁹ et His²⁰⁷, nécessaires aux activités peroxidase et cyclooxygénase de l'enzyme. Le premier est le ligand proximal du hème, le second le ligand axial, tandis que le dernier est situé sur le côté distal du hème sans toutefois le lier formellement (9;39;50;58). Il y a aussi le résidu Tyr³⁸⁵ dont la chaîne latérale est située entre les sites de liaison de l'AA et de PGG₂ dans le site actif cyclooxygénase, au sommet du tunnel (50). La formation d'un radical tyrosyl serait impliquée dans l'initiation de la réaction cyclooxygénase en attirant un hydrogène 13-proS du substrat AA, mais ne serait pas requis pour l'activité peroxidase (59). De plus, ce radical tyrosyl pourrait être impliqué dans l'inactivation suicide de PGHS-1 par laquelle l'activité cyclooxygénase arrête de fonctionner 1-2 min après l'exposition au substrat (9). Par ailleurs, l'Arg¹²⁰ est aussi localisée dans le tunnel du site actif et sert de contre-ion pour le groupement carboxylate de l'AA et des NSAID (50;60). La Tyr³⁵⁵, située sur le côté opposé du site actif relativement à l'Arg¹²⁰, administre la stéréospécificité de PGHS-1 envers les NSAID (50). D'autrepart, c'est la chaîne latérale de la Ser⁵³⁰, aussi située dans le canal hydrophobique, qui est acétylée par l'Aspirin, ce qui entraîne une inactivation irréversible de l'activité cyclooxygénase sans affecter l'activité peroxidase (61). En effet, l'acétylation bloque l'accès de l'AA au site actif cyclooxygénase en plaçant un groupement acétyl, stériquement encombrant, sur la Ser⁵³⁰ qui s'avance ainsi dans le canal hydrophobique (39).

1.4 Clonage et caractérisation du gène *PGHS-1*

Environ 10 ans se sont écoulés entre la purification de la protéine et le clonage de l'ADNc de *PGHS-1* du mouton (37;40;43), de l'homme (38;62) et de la souris (39). Chez l'homme, le gène est situé sur le bras long du chromosome 9 (9q32-q33.3), il s'étend sur 22.5 kb et contient 11 exons et 10 introns. Les exons 1 et 2 contiennent le site d'initiation de la traduction et le peptide signal (38;62;63). Le promoteur de *PGHS-1* partage les propriétés caractéristiques d'un gène domestique: il ne possède pas de boîte TATA, contient plusieurs sites d'initiation de la transcription et a une séquence riche en GC (63;64). Bien que le promoteur de *hPGHS-1* contienne des sites d'interaction potentiels pour les activateurs de transcription AP2, Sp1, NF-IL-6, SSRE, NF-κB, GATA-1 et PEA3 (64;65), il n'a pas montré d'induction transcriptionnelle significative (36;62;66-68).

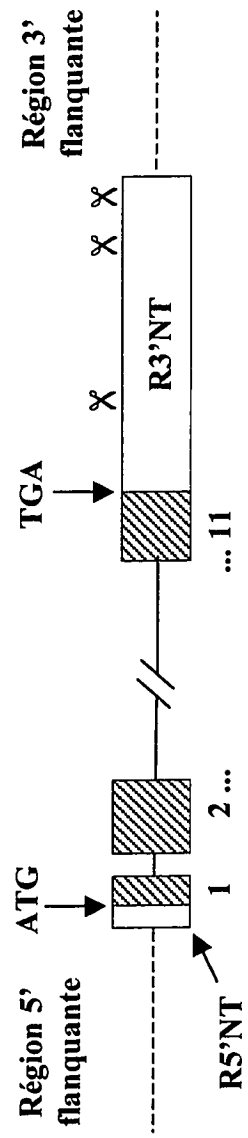
La transcription du gène *PGHS-1* donne naissance à des ARNm dont le cadre ouvert de lecture mesure 1.8 kb (39;43;62). Cette région est bordée en amont, d'une courte R5'NT de 35 nts¹ et en aval, d'une R3'NT pouvant mesurer jusqu'à 3.3 kb. En effet, chez l'humain, 3 transcrits de *PGHS-1*, dérivés d'une polyadénylation alternative et se différenciant par la longueur de leur R3'NT, ont été identifiés. Le plus abondant des trois, et le plus court, est le transcrit de 2.8 kb, dont les séquences, codante et R3'NT, ont été déterminées dès 1988 et ce, chez plusieurs espèces (37;39;62). Ce transcrit est dérivé d'un site de polyadénylation canonique AATAAA et ne contient qu'un seul motif d'instabilité AUUUA, situé à environ 125 nts après le codon d'arrêt (69). La nature moléculaire du transcrit de 5.1 kb a été rapportée plus tard, en 1996 (69). Il s'agit du

¹ Observation non-publiée: O. Laneuville

plus long des trois transcrits et du plus faiblement exprimé. Il contient les trois motifs d'instabilité retrouvés dans la R3'NT de PGHS-1. En effet, 2 des 3 motifs sont situés vers l'extrémité 3' de la R3'NT en aval du site de polyadénylation pour le transcrit de 4.5 kb (12). Le peu de motifs d'instabilité retrouvés dans la R3'NT contribue probablement au fait que l'ARNm de PGHS-1 soit un ARNm relativement stable. Le dernier transcrit est celui de 4.5 kb, identifié récemment par notre laboratoire. Il origine d'un site de polyadénylation alternatif non-canonique (AAGAAA) et il est détecté principalement dans les MEG-01 et la vessie; son profil d'expression varie en fonction des tissus (12). La structure du gène PGHS-1 et la localisation des trois sites de polyadénylation sont illustrées à la figure 1.3.

Étant donné la nature constitutive de PGHS-1, il fut généralement assumé qu'une souris déficiente en enzyme PGHS-1 souffrirait de diverses pathologies et défauts physiologiques. Toutefois, aucun changement significatif n'a été observé chez ces souris (70). Il s'est avéré que les souris déficientes en PGHS-1 se développaient normalement et ne présentaient aucun problème de santé apparent (70). Différents paramètres ont été étudiés, dont celui de la formation d'ulcères. Étant donné que le présumé mécanisme d'ulcération gastrique est l'inhibition de PGHS-1 par les NSAID, le fait que les souris déficientes en PGHS-1 n'aient pas d'augmentation du nombre d'ulcères spontanés fut un résultat contraire aux attentes. Ceci suggérait que l'absence de PGHS-1 en elle-même, et donc son inhibition, n'était pas suffisante pour causer des lésions (70). D'ailleurs, ces souris étaient moins sensibles à l'induction d'ulcères par les NSAID. D'autre part, une méthode standard pour tester le degré d'inflammation induit par l'application d'un irritant sur l'oreille, soit l'AA ou le TPA, a montré une diminution de la réponse inflammatoire à

Figure 1.3: **Structure du gène *hPGHS-1*.** Le gène *hPGHS-1* est situé sur le chromosome 9 et contient 11 exons qui donnent lieu à un cadre ouvert de lecture de 1.8 kb. La R5'NT est courte cependant, la R3'NT s'étend jusqu'à 3.3 kb et contient 3 sites de polyadénylation qui donnent naissance à trois transcrits de 2.8, 4.5 et 5.1 kb.



□ = région non traduite

▨ = exon

✂ = signal de polyadénylation

court terme (2 hrs) envers l'AA; PGHS-2 étant probablement responsable de la réponse à long terme. Toutefois, la réponse au TPA n'a pas changé, suggérant que PGHS-2 était davantage impliquée dans cette réponse que PGHS-1 (70). Comme prévu, l'enzyme PGHS-1 étant impliquée dans l'agrégation des plaquettes, un changement dans la courbe d'agrégation a été observé. En effet, la courbe d'agrégation pour les plaquettes provenant de souris homozygotes mutantes a montré que l'agrégation était plus lente et moins prononcée, comparativement aux plaquettes des souris non-mutantes (70). Enfin, le dernier aspect étudié, celui de la reproduction, représente peut-être la plus sérieuse des déficiences affectant ces souris. Bien qu'elles soient fertiles, capables de se reproduire et de mener à terme la gestation, ces souris sont incapables de donner une progéniture viable lorsque deux homozygotes mutants sont croisés. En effet, la majorité des souriceaux, malgré qu'ils soient de taille normale, sont morts à la naissance (70). L'augmentation du nombre de mort-nés pourrait s'expliquer par le retard de la mise-bas de 1-2 jours, ce qui entraîne la mort intra-utérine par dystocie. Par ailleurs, tel que démontré dans une autre étude, les souris *PGHS-1*^{-/-} ne présentaient pas de différences significatives dans les fonctions pulmonaires et dans l'analyse histopathologique des poumons, comparativement au souris de type sauvage, même si la production de PGE₂ était dramatiquement réduite. L'activité de PGHS-1 limiterait donc en partie l'inflammation allergique du système respiratoire (30). Suite à différentes études sur les souris *PGHS-1*^{-/-} et à celles sur les souris *PGHS-2*^{-/-} (71), il s'est avéré que la production de TxA₂ par les plaquettes n'impliquait que l'isoforme PGHS-1. L'enzyme PGHS-1 serait aussi responsable de la formation de la PGF_{2α} nécessaire à la parturition, toutefois, dans certaines conditions pathologiques, l'isoforme PGHS-2 pourrait

compenser la production de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en l'absence de PGHS-1 (72). Par ailleurs, contrairement à ce qui avait été proposé pour les rôles respectifs de PGHS-1 et PGHS-2 dans l'ulcération gastrique et l'inflammation, ces processus mettraient en jeu les deux isoformes.

1.5 Régulation de l'expression du gène *PGHS-1*

L'enzyme PGHS-1 est considérée comme une enzyme domestique parce qu'elle est exprimée dans plusieurs tissus à des niveaux faibles et constants. En accord avec son mode d'expression constitutif, PGHS-1 synthétise des prostanoïdes qui sont principalement impliquées dans le maintien normal et continu de fonctions physiologiques nécessitant un apport constant en prostanoïdes, telles que la production du mucus gastrique, la régulation du flot sanguin rénal et l'agrégation des plaquettes (15). Pourtant, de hauts niveaux d'enzyme sont présents dans certains types cellulaires hautement différenciés et spécialisés, tels que l'endothélium, les macrophages, les plaquettes, les tubules collecteurs rénaux et les vésicules séminales (9). En effet, des changements dans l'expression de PGHS-1 ont été observés dans certains systèmes de développement et de différenciation. Ces études ont montré que les niveaux d'ARNm et de protéines PGHS-1 pouvaient varier suivant la progression du processus physiologique. Notamment, au cours du développement de l'artère pulmonaire chez l'agneau; les niveaux d'ARNm de PGHS-1 dans le poumon sont élevés chez un nouveau-né de 4 semaines comparativement à un fœtus de 125 jrs où l'ARNm de 2.8 kb est minimalement détectable (73). L'analyse des niveaux de protéine dans l'artère pulmonaire a aussi révélé une augmentation d'environ 6 fois entre ces deux stades (73).

Un autre exemple est celui de la différenciation des monocytes THP-1 en macrophages, sous l'action du TPA qui entraîne des changements phénotypiques, tels que l'attachement à la surface du flacon, l'augmentation de l'activité phagocytaire et l'engagement dans un état non-prolifératif terminal (74). Dans ce système, la différenciation cellulaire est accompagnée par une augmentation des niveaux d'enzyme PGHS-1 et de la capacité de produire des prostaglandines (75;76). Une autre induction de l'expression de *PGHS-1* associée au processus de différenciation a aussi été rapportée dans des neuroblastomes (lignées NG108 et N2a) induits à se différencier par l'ajout d'acide rétinoïque (77). Dans ce modèle, les niveaux d'ARNm de PGHS-1 augmentent en 24 hrs alors que l'augmentation des niveaux de protéine est retardée jusqu'à 48 hrs après l'induction. Le glucocorticoïde dexaméthasone amplifie cet effet de 2-3 fois. L'acide rétinoïque semble agir au niveau de la transcription alors que le dexaméthasone augmenterait la stabilité de l'ARNm. Ces résultats sont intéressants, puisque contrairement à l'effet négatif qu'ont généralement les corticoïdes sur l'expression de PGHS-1 dans la plupart des cellules, dans ce cas-ci, une augmentation de l'expression est observée durant la différenciation neuronale induite par les corticoïdes (77). Une autre observation importante dans ce modèle est le délai de 24 hrs observé entre les augmentations d'ARNm et de protéines. Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de cette régulation du gène lors de la différenciation ou du développement ne sont pas encore élucidés.

Puisque PGHS-1 est exprimée de façon constitutive dans plusieurs tissus et que ses niveaux d'expression ne varient pas grandement dans les animaux adultes, il a été difficile d'étudier la régulation transcriptionnelle de ce gène. Comme décrit plus haut, le promoteur du gène *PGHS-1* est caractéristique des promoteurs de gènes domestiques

(64), sans grande activité transcriptionnelle; des études ont montré que des segments de la région 5' flanquante du gène *PGHS-1* ne pouvaient stimuler que des niveaux minimes de transcription d'un gène rapporteur (36;68). Récemment, une étude des 1000 premières bases du promoteur dans la région 5' flanquante a montré que deux éléments Sp1, aux positions -111/-105 et -610/-604 liés par les protéines Sp1 en *trans*, contribuaient à 73% de l'activité de base médiée par cette région du promoteur *PGHS-1* (65). À cause du faible taux d'activation transcriptionnelle observé pour le gène *PGHS-1*, il a été suggéré que la R3'NT dont la séquence est bien conservée à travers les espèces, pourrait jouer un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *PGHS-1* (62).

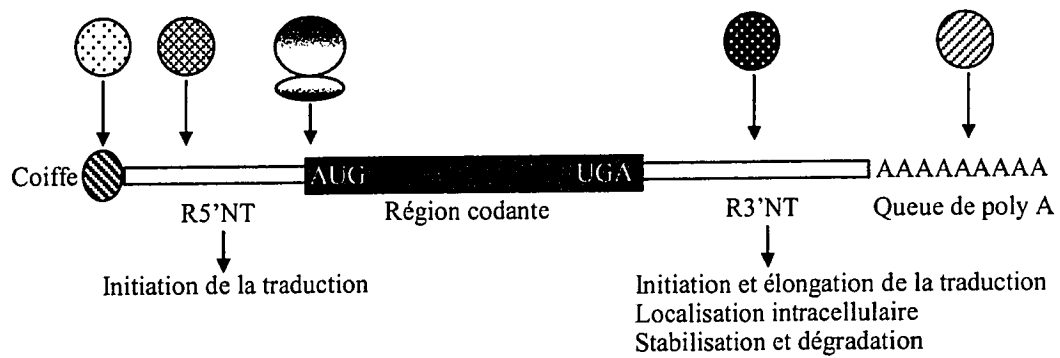
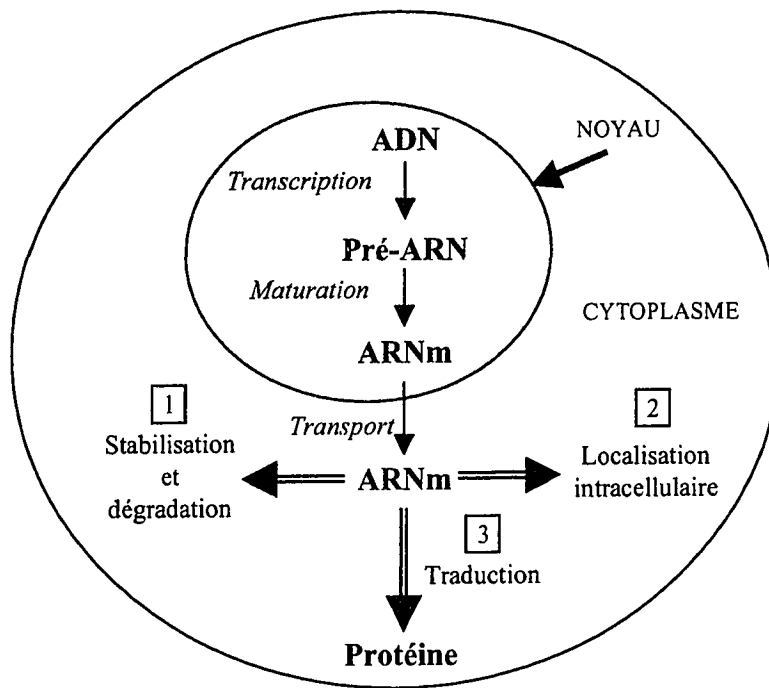
1.6 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique

Voici un bref aperçu des effets médiés par les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle agissant au niveau de l'ARNm. En effet, il est bien connu qu'après sa synthèse et sa maturation dans le noyau, l'ARNm transporté dans le cytoplasme est constamment soumis à des mécanismes de régulation qui affectent sa stabilité, sa localisation et l'efficacité de sa traduction. Ces mécanismes dépendent d'interactions spécifiques ARN-protéine dont l'élément-*cis* est souvent localisé dans les régions non-traduites (Fig 1.4) (78;79).

-Stabilité de l'ARNm

Même si la majorité des ARNm portent une coiffe de guanine méthylée en 5' et une queue de poly(A) en 3' qui les protègent contre la dégradation 5'-3' ou 3'-5',

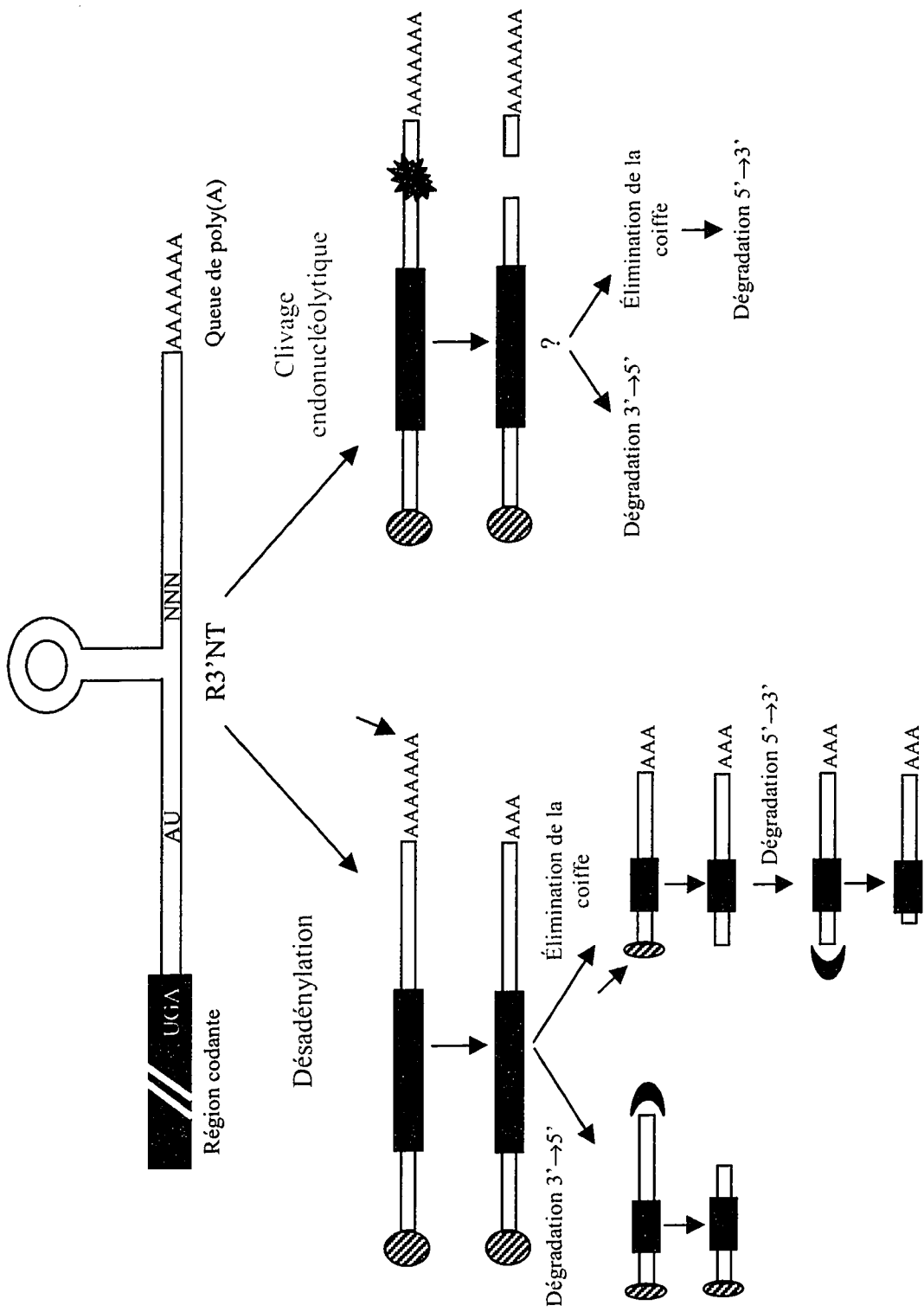
Figure 1.4: Régulation post-transcriptionnelle des ARNm médiée par les RNT.
Haut- La transcription de l'ADN en pré-ARN et la maturation de ces derniers en ARNm ont lieu dans le noyau des cellules eucaryotes. Les ARNm sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils sont soumis à différents mécanismes de régulation post-transcriptionnelle relayés par les RNT. *Bas-* Les interactions entre ces RNT de l'ARNm et des protéines régulatrices à effet en *trans* contrôlent l'efficacité de la traduction, l'adressage intracytoplasmique et la stabilité/dégradation de l'ARNm. (Adaptée de Pallier, C., 2001 (79)).



d'autres éléments internes déstabilisants peuvent aussi influencer la stabilité intrinsèque des ARNm. Les plus communs sont les ARE (*Adenosine and Uridine-rich element*), présents dans la R3'NT de nombreux ARNm instables, et qui favorisent le raccourcissement de la queue de poly(A), suivi ou non de l'enlèvement de la coiffe, et par conséquent d'une dégradation de l'ARNm par des exonucléases (80) (Fig. 1.5). Le décoiffage et la subséquente dégradation 5'-3' du transcrit, en absence de désadénylation préalable, sont aussi observés (81) (Fig. 1.5). Les ARE sont de taille variée, 50 à 150 nts, et contiennent plusieurs copies des motifs AUUUA ou AUUU, ainsi qu'un fort contenu en résidues uridines (U) (80). D'autres variations sont aussi observées, telles que la présence de trois copies du motif GUUUG dans un contexte riche en résidus A (Adénosine) et U (82). Cependant, la seule présence d'un motif AUUUA, même dans un contexte riche en résidus A et U, ne garantit pas une fonction déstabilisante (83).

Plusieurs ARNm de lymphokines, de cytokines et de proto-oncoprotéines doivent leur instabilité à des ARE présents dans leur 3' RNT (84). Des protéines cytoplasmiques et nucléaires, dites AUBP (*AU-rich element binding protein*), semblent agir en *trans* pour réguler la dégradation ARE-dépendante de certains ARNm. Par exemple, les niveaux d'ARNm de GM-CSF (*Granulocyte/macrophage colony-stimulating-factor*) sont contrôlés post-transcriptionnellement par le ARE de sa 3' RNT (84); lorsque l'ARE de *GM-CSF* est fixé par la protéine RNPhn A1 (Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire A1), la stabilité de l'ARNm augmente (85). À l'opposé, la protéine cytosolique AUF1 (86) semble accélérer l'instabilité d'ARNm, tel que *c-myc* ou *GM-CSF*, par sa

Figure 1.5: Rôle de la R3'NT dans la régulation de la stabilité des ARNm. La R3'NT peut médier la dégradation de l'ARNm de différentes façons. *À gauche*- Il peut y avoir d'abord, une réaction de désadénylation médiée par les ARE localisés dans la R3'NT, qui se poursuit par la digestion par des exoribonucléases avec ou sans l'élimination de la coiffe. Des complexes protéiques pourraient se fixer à ces éléments ARE et influencer la stabilité de l'ARNm. *À droite*- Clivage par une endoribonucléase qui reconnaît un site spécifique, soit une structure secondaire ou une séquence particulière dans la R3'NT, en absence de protéine régulatrice fixant ce site, ce qui entraîne la perte de la queue de poly(A) et rend l'ARNm instable, susceptible à la dégradation par les exoribonucléases. (Adaptée de Pallier, C., 2001 (79)).



fixation sur leur ARE (87;88). Toutefois, cette même protéine, AUF1, stabilise le transcrit de PTH (hormone parathyroïdienne) par sa fixation à une région riche en résidus A et U de la R3'NT de PTH, qui n'a cependant pas la configuration d'un ARE classique (89).

Comme mentionné pour l'exemple de PTH, la stabilité d'un ARNm particulier peut être régulée par l'association de protéines à un motif de la R3'NT qui, bien que souvent riche en U, ne contient pas les motifs AUUUA classiques. Ces éléments sont souvent conservés et uniques à cet ARNm. De même, les protéines régulatrices agissant en *trans* sont parfois restreintes à un type de cellules soumises à des conditions particulières. Par exemple, dans les cellules myéloïdes stimulées avec le TPA, l'ARNm de la protéine ferritine-H est stabilisé. En effet, lorsqu'un facteur cytoplasmique fixe de façon spécifique une séquence riche en pyrimidine de la R3'NT de l'ARNm *ferritine-H*, cette association agit comme un signal de déstabilisation qui faciliterait la dégradation de l'ARNm. Toutefois, le TPA aurait pour effet de diminuer cette interaction et donc de stabiliser l'ARNm (90).

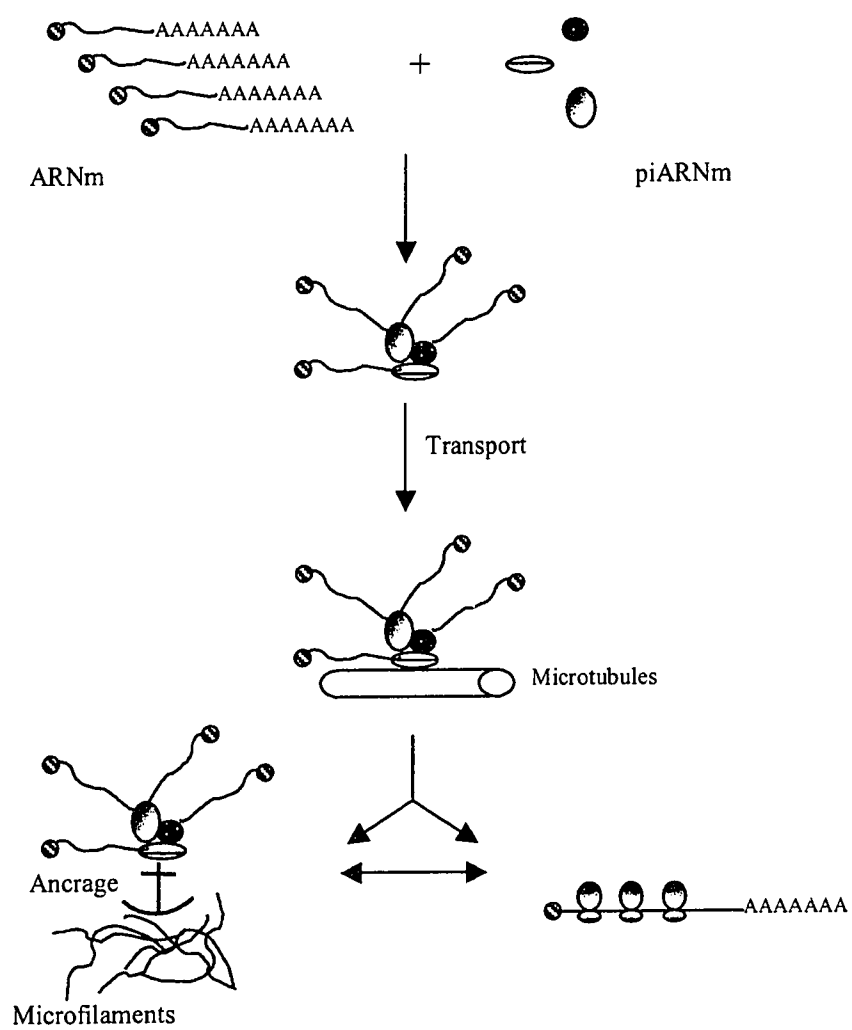
D'autrepart, les ARNm peuvent également être dégradés par des endonucléases avant que la désadénylation survienne. En effet, des séquences particulières ou des structures secondaires présentes dans la R3'NT peuvent contenir des sites de clivage qui affectent la demi-vie des ARNm. Par ailleurs, la fixation de facteurs protéiques à ces éléments peut stabiliser l'ARNm en masquant les sites de clivage (Fig. 1.5). Par exemple, l'ARNm du récepteur transferrine contient des éléments IREs (*iron response elements*) qui, lorsque la concentration de fer est élevée, sont libérés de leur facteur protéique régulateur. Ceci rend les sites de clivage adjacents accessibles aux nucléases

qui dégradent l'ARNm. Donc, en présence d'une forte concentration de fer, cette dégradation de l'ARNm du récepteur transferrine par des endonucléases n'implique pas un raccourcissement préalable de la queue de poly(A) (91).

-Localisation de l'ARNm

Un second aspect de la régulation des ARNm par la R3'NT est celui de la localisation cytoplasmique. En effet, les éléments permettant l'adressage des ARNm et leur rétention au niveau des différents compartiments cytoplasmiques sont essentiellement situés dans les R3'NT (92). L'interaction de ces éléments-*cis* avec des protéines régulatrices qui agissent en *trans* permet de concentrer l'ARNm à l'endroit dans la cellule où sa protéine sera nécessaire (92) (Fig. 1.6). Le meilleur exemple pour illustrer l'importance du contrôle de la localisation des ARNm est celui du développement de la drosophile. Ce contrôle de la localisation, médié par des interactions ARN-protéines, assure la segmentation normale du corps (tête, thorax et abdomen) (93). Deux des principaux facteurs responsables de l'organisation de l'axe antéro-postérieur de l'oocyte sont les protéines Nanos (Nos) et Bicoïde (Bcd). La protéine Nos, étant requise dans le développement abdominal, est plus concentrée dans la partie postérieure où elle inhibe la traduction de l'ARNm *Hunchback* (*Hb*), normalement requis dans le développement des parties antérieures. L'ARNm *Nos* est localisé au pôle postérieur via des séquences particulières de sa R3'NT (94). À l'opposé de *Nos*, l'ARNm *Bcd* est concentré dans la partie antérieure de l'oocyte où il régule la transcription de *Hb* (95). La localisation de *Bcd* dans la partie antérieure est également médiée par la R3'NT via des interactions avec les protéines Staufén, Swallow et Exupe-

Figure 1.6: Rôle de la R3'NT dans la régulation de la localisation et du transport des ARNm. La fixation de protéines régulatrices dans la R3'NT des ARNm peut influencer leur localisation cytoplasmique. Ces protéines ont la capacité de conduire les ARNm, via des interactions avec le cytosquelette, vers leur compartiment cytoplasmique cible où ils y sont maintenus, jusqu'au moment de leur traduction. (Adaptée de Pallier, C., 2001 (79)).



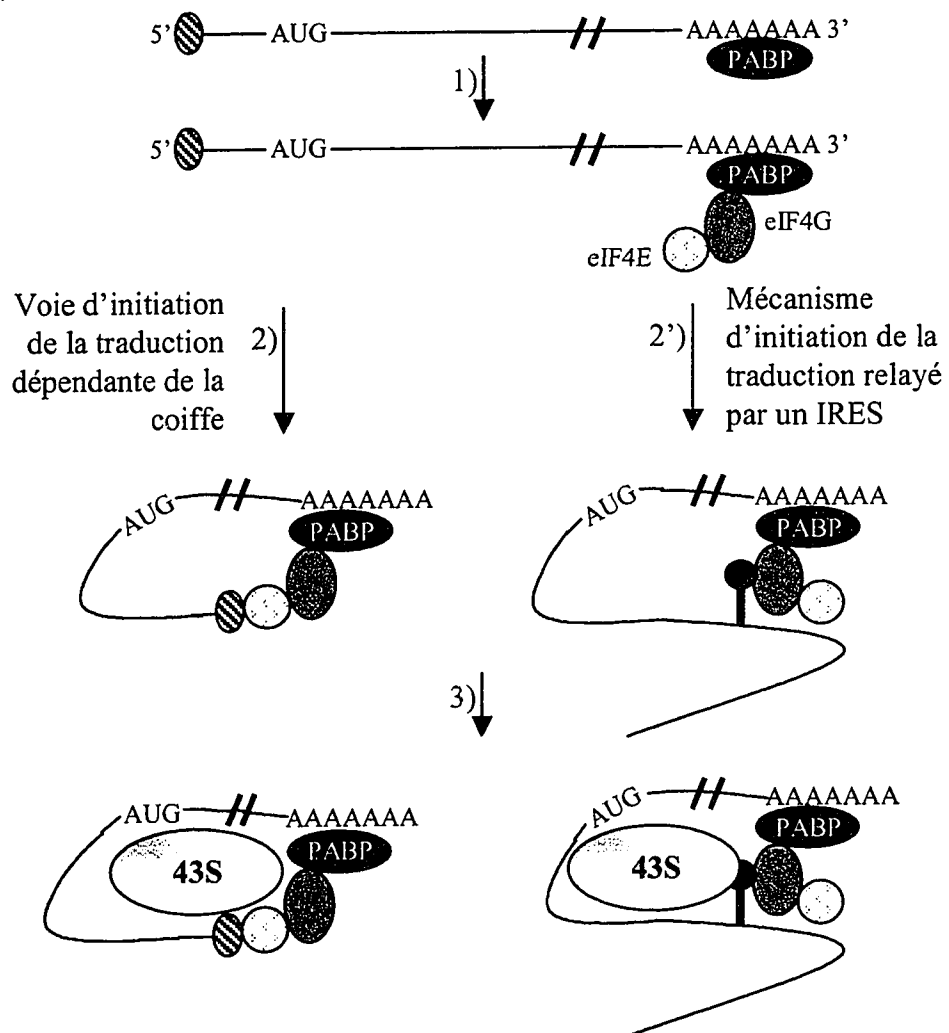
rantia (96). En plus de la R3'NT, la localisation de certains ARNm demande la participation du cytosquelette. Dans le cas de *Bcd*, les microtubules semblent avoir un rôle essentiel à jouer dans la localisation de ce dernier au pôle antérieur (97). La protéine Staufén s'associe spécifiquement avec la R3'NT de *Bcd* afin de l'ancrer dans la partie antérieure du cytoplasme. La formation de ce complexe ribonucléoprotéique messenger (RNPm) ainsi que son déplacement vers le pôle antérieur semblent être dépendants d'une association avec les microtubules (98). Par ailleurs, pour le complexe RNPm formé de la protéine Exuperantia et de l'ARNm *Bcd*, il a été proposé que s'il ne s'attachait pas directement aux microtubules, il pourrait être dirigé vers le pôle antérieur au moyen de son association avec un autre facteur qui lui-même, serait localisé par les microtubules (99) (Fig. 1.6). Les protéines fixées à la R3'NT des ARNm devant être localisés, interagissent donc de façon directe ou non avec le cytosquelette. Des exemples de localisation d'ARNm dans des cellules mammifères, notamment lors de la spermatogénèse, ont également été rapportés. Par exemple, des études sur des souris transgéniques ont établi l'importance de la R3'NT de l'ARNm *Prm-1* (*spermatid-specific protamine-1*) dans son contrôle traductionnelle. L'ARNm *Prm-1* est un ARNm spécifique des cellules germinales mâles qui est stocké sous forme de RNPm jusqu'à sa traduction à un moment précis de la spermatogénèse. Il a été montré que la protéine Spnr (*spermatid perinuclear RNA-binding protein*) qui fixe la R3'NT de *Prm-1* était localisée aux manchettes, un arrangement microtubulaire spécifique aux spermatides. Étant donné l'association de Spnr avec les manchettes, il a été suggéré que cette protéine pourrait relier les ARNm des spermatides avec le cytosquelette et jouer ainsi un rôle dans le transport ou l'activation traductionnelle de ces ARNm (100).

-Efficacité traductionnelle de l'ARNm

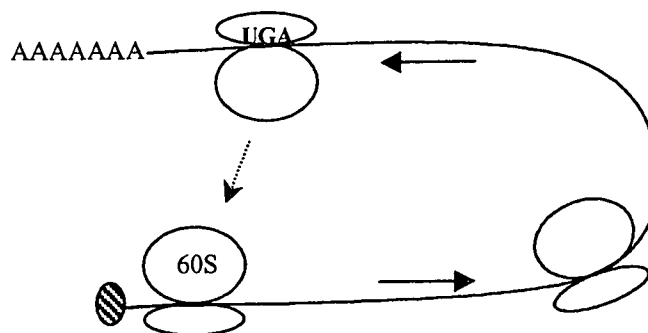
La régulation post-transcriptionnelle s'exerce souvent au niveau de l'initiation de la traduction plutôt qu'aux étapes d'élongation et de terminaison. Une régulation globale de l'étape d'initiation est médiée par des modifications post-traductionnelles des facteurs d'initiation eucaryotiques (eIf), telles que la phosphorylation (101). Par contre, le contrôle de l'initiation d'un ARNm particulier, visant à fournir un contrôle temporel de l'expression de ce gène, est déterminé tout d'abord par les propriétés structurales de la R5'NT de cet ARNm. Ainsi, la R5'NT influence l'accessibilité de la coiffe aux eIFs et l'habileté de la sous-unité ribosomale 40S de fixer et de balayer l'ARNm afin d'identifier le codon d'initiation AUG potentiel et la séquence Kozak l'entourant (101;102). La R5'NT peut donc agir comme un inhibiteur traductionnel. Deux modèles d'initiation ont été identifiés, le modèle par balayage dépendant de la coiffe, le mieux caractérisé et le plus commun, et le modèle par entrée interne des ribosomes (IRES) (Fig. 1.7A) (103). La présence de structures secondaires dans une longue R5'NT (~1000 nts), riche en GC favorise une traduction coiffe-indépendante. Par exemple, l'expression de PDGF2 (*platelet-derived growth factor 2*) est régulée au niveau traductionnel durant la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562. L'inhibiteur traductionnel dans ce cas-ci est la R5'NT qui est anormalement longue, 1022 nts, et qui forme des structures secondaires empêchant la migration des ribosomes (104). Par contre, ce mécanisme de régulation ne s'applique probablement pas à l'expression du gène *PGHS-1* étant donné que la R5'NT de PGHS-1 ne mesure que 35 nts. D'autrepart, bien que de façon générale, l'étape limitante de la traduction soit l'initiation, l'existence de mécanismes de régulation au niveau de l'élongation a été démontré. C'est le cas de la répression de la traduction

Figure 1.7: Rôle de la R3'NT dans la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm. **A)** La R3'NT est impliquée dans l'initiation de la traduction au moyen de la queue de poly(A) qui participe au recrutement de la sous-unité 40S via des interactions entre la PABP et le facteur eIF4G complexé avec eIF4E (1). La circularisation de l'ARNm est possible par l'interaction de eIF4E avec la coiffe (2) ou par celle de eIF4G avec l'IRES (2'). La capture du complexe de pré-initiation 43S serait alors facilitée (3). **B)** D'autre part, la circularisation de l'extrémité R3'NT favoriserait le recyclage des sous-unités 60S en direction de l'extrémité 5'. (Adaptée de Pallier, C., 2001 (79)).

A)



B)



de l'ARNm *lin-14* de *C. elegans*. La répression de la traduction de l'ARNm *lin-14* a la particularité d'être médiée par un ARN cytoplasmique (*lin-4*) court et complémentaire à un segment de la R3'NT de *lin-14* (105). L'interaction de *lin-4* avec l'ARNm *lin-14* ne semble pas nuire à l'association de l'ARNm avec les polysomes, présumant que l'étape de l'élongation est celle qui serait affectée par cette interaction ARN-ARN.

Les caractéristiques de la R3'NT et du cadre ouvert de lecture peuvent aussi avoir des effets importants sur la régulation traductionnelle. La R3'NT, dont les effets dépendraient de la taille de la queue de poly(A) et de la présence de la coiffe, participerait à l'optimisation de l'initiation de la traduction (106;107). L'identification d'interactions physiques et fonctionnelles entre les deux extrémités de l'ARNm et leurs facteurs associés a favorisé le modèle de circularisation de l'ARNm (Fig. 1.7A) (108). Dans ce modèle, la queue de poly(A) et la coiffe entreraient en contact indirectement via les eIFs, tels que eIF-4E et eIF-4G, ainsi que la PABP (*poly A binding protein*) qui s'associe à la queue de poly(A) de l'ARNm cytoplasmique et forme un complexe ribonucléoprotéique sur la R3'NT, qui a pour fonction de protéger l'ARNm de la dégradation (108;109). Ce modèle favoriserait ainsi le recrutement de la sous-unité 40S et la ré-initiation de la traduction en permettant le recyclage des sous-unités 60S en direction de l'extrémité 5' du même ARNm et en protégeant les extrémités contre la dégradation (Fig. 1.7B) (106;107). Cependant, la coiffe et la queue de poly(A) ne sont pas toujours impliquées dans la répression. C'est le cas de la traduction de l'ARNm *Oskar* réprimée par la protéine Bruno fixée dans la R3'NT. Le rôle proposé pour Bruno serait, avec d'autres partenaires, de prévenir l'assemblage complet du ribosome (110).

Par ailleurs, la traduction d'ARNm qui n'ont pas de queue de poly(A), tels que ceux des histones, est souvent augmentée par des séquences ou structures dans leur R3'NT (111).

Plusieurs des exemples connus de répression médiée par la fixation de facteurs à la R3'NT concernent la régulation de l'efficacité de la traduction durant le développement. Ainsi, le modèle de la drosophile a également permis de constater l'importance de la R3'NT dans la répression de la traduction des ARNm qui n'ont pas été localisés. Par exemple, la protéine Pumilio lie des séquences spécifiques dans la R3'NT de *Hunchback* afin de réprimer son expression dans la partie postérieure (95). De même, la répression de la traduction des ARNm *Nos* non-localisés et présents dans la partie antérieure est médiée par un élément de 90 nts dans sa R3'NT fixé par la protéine Smaug (112;113). En fait, ce mécanisme serait même prédominant par rapport au mécanisme de localisation puisqu'il a été montré que seule une faible proportion des ARNm de *Nos* étaient effectivement localisés au pôle postérieur (114). D'autrepart, des exemples avec les cellules somatiques sont aussi rapportés, tels que l'inhibition de la traduction de l'ARNm *15-LOX* (*15-lipoxygénase*) durant la différenciation des érythrocytes, via un motif répété de 19 nts dans la R3'NT fixé par les protéines RNPhn E1 et K (115;116). Enfin, les motifs riches en résidus A et U, situés dans la R3'NT et souvent impliqués dans la stabilité des ARNm de cytokines, peuvent également avoir un rôle dans l'efficacité de la traduction, tel que démontré pour les ARE des ARNm de TNF- α et de l'interféron β (117;118).

1.7 Mégacaryocytes et modèle expérimental

Afin d'étudier la régulation de *PGHS-1*, nous nous sommes servi d'un modèle expérimental utilisant les cellules mégacaryoblastiques MEG-01, précurseurs de plaquettes. En effet, PGHS-1 est présente à des taux élevés dans les plaquettes sanguines où elle est l'isoforme majoritaire (62). L'activation de la cascade de l'acide arachidonique dans les plaquettes par un stimulus, tel que la thrombine, est responsable de la synthèse de TxA_2 (8;33). La sécrétion de TxA_2 active les plaquettes avoisinantes et les cellules vasculaires lisses, ce qui a pour effet d'entraîner l'agrégation des plaquettes et la constriction des vaisseaux environnant le lieu de la lésion (33). L'importante contribution de PGHS-1 dans les maladies thromboemboliques justifie la nécessité de déterminer le mécanisme par lequel les niveaux de PGHS-1 sont régulés dans les plaquettes.

Puisque les plaquettes sont des cellules anucléées et sont généralement considérées incapables de synthétiser de grande quantité protéines, leur haut contenu en enzyme PGHS-1 résulte de l'expression du gène dans les cellules précurseurs. En effet, les plaquettes libérées dans la circulation sont le résultat d'un processus de maturation, la mégacaryopoïèse, qui s'active dans la moelle osseuse (119). Les cellules précurseurs, les mégacaryocytes, ne représentent que $<0.1\%$ des cellules mononucléaires de la moelle osseuse pourtant, près de 10^{12} plaquettes ayant une durée de vie de 7 à 10 jours, circulent dans un être humain adulte (120). Les mégacaryocytes possèdent un système de membranes lisses, différent du RE, nommé DMS (*demarcation membrane system*). Cet organel, spécifique aux mégacaryocytes, est en continuité avec la membrane plasmique et divise le cytoplasme des cellules matures en "champs de plaquettes" (121;122). Une

fois les plaquettes libérées, les mégacaryocytes sénescents sont constituées d'un large noyau enveloppé d'une mince couche de cytoplasme (122). Dans les mégacaryocytes, l'enzyme PGHS-1 est associée avec le DMS et l'enveloppe nucléaire (123) et dans les plaquettes, elle est localisée dans le système tubulaire dense (124;125).

Parmi les lignées hématopoïétiques établies, la lignée MEG-01 a fait l'objet de plusieurs travaux visant à comprendre la mégacaryopoïèse (11;126-128). La lignée mégacaryoblastique MEG-01 fut isolée d'un patient souffrant d'une leucémie mégacaryoblastique (129). Ces cellules retiennent les propriétés fonctionnelles et morphologiques des cellules mégacaryocytes de la moelle osseuse (11) et elles sont capables de différenciation *in vitro* après plusieurs passages en culture ou lorsqu'elles sont soumises à l'action du TPA (11;126-128). La différenciation de ces cellules par le TPA (11;130) engendre des transformations cellulaires similaires à celles observées dans le processus de maturation non-induite (10), telles que la multiplication du génome (2N 4N ...32N), l'expression de marqueurs spécifiques, l'arrêt de la croissance cellulaire, la formation de filaments cytoplasmiques et la libération de plaquettes. En culture, les mégacaryocytes stimulées, soit avec la thrombine ou le TPA, s'attachent et s'étendent sur le fond du flacon; ce phénomène est médié par les récepteurs glycoprotéines IIb/IIIa et une augmentation de l'activité de la protéine kinase C (131). De plus, selon le degré de différenciation, trois populations de MEG-01 sont observées: les cellules flottantes nucléées, les cellules nucléées qui adhèrent au flacon et les cellules flottantes anucléées, qui se rapprochent du stade plaquettaire (129). La différenciation stimulée par le TPA a également été étudiée avec des mégacaryocytes de souris (132) et dans de nombreuses autres lignées cellulaires hématopoïétiques: UT7

(mégacaryocytaire) (133), K562 (mégacaryocytaire/érythroïde) (104), CMK (mégacaryocytaire) (134), HL-60 (promyélocytaire/granuloïde) (135) et THP-1 (monocytaire) (75).

Dans notre modèle *in vitro*: les MEG-01 stimulées avec une seule addition de TPA (16 nM), l'expression du gène PGHS-1 peut être induite et cette induction est soutenue tout au long de la période de différenciation (12). Après stimulation des MEG-01 avec le TPA, les plus hauts niveaux de protéines PGHS-1 sont détectés dans les cellules les plus différenciées, la population de cellules flottantes anucléées, alors que les niveaux d'ARNm sont les plus élevés dans la population adhérente nucléée (136). Par le fait même, les niveaux de protéine PGHS-1 peuvent servir de marqueur de différenciation. Une induction de l'expression de PGHS-1 dans des mégacaryoblastes a également été rapportée durant la différenciation des cellules CMK (137) exposées à une plus grande concentration de TPA, soit 100 nM (138). Dans ces cellules, l'ARNm de PGHS-1 augmentait lentement et de façon continue, entre le premier et le quatrième jour, et la protéine semblait augmenter parallèlement à l'ARNm et à l'activité. D'autre part, un groupe a montré que durant la différenciation des MEG-01 avec 100 nM de TPA, sur une période de 5 jrs, seules de petites variations dans les niveaux d'ARNm de PGHS-1, mesurés par RT-PCR, avaient été observées. L'ARNm de PGHS-1 n'augmentait que légèrement après 24h et se maintenait à ce niveau par la suite, alors que l'induction de la protéine était continue et atteignait un plateau après 3 jrs de stimulation au TPA (139). Les différences observées dans les taux d'ARNm et de protéines détectés dans notre modèle après 24h peuvent dépendre de la méthode employée pour la détection et de la quantité de TPA utilisé pour stimuler la différenciation. En effet, dans notre modèle *in*

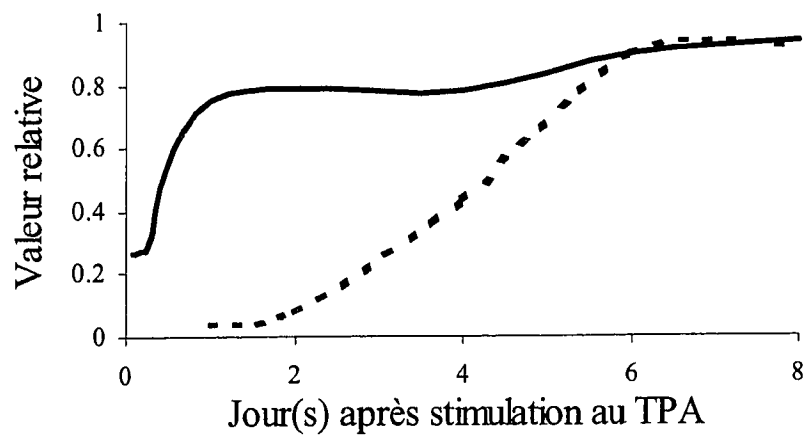
vitro, une étude temporelle des cellules MEG-01 stimulées au TPA a permis d'examiner de façon plus détaillée l'induction du gène *PGHS-1*. Nous avons observé par hybridation Northern, une augmentation rapide des niveaux d'ARNm *PGHS-1* aussi tôt que 6 hrs après l'addition de TPA(12). De plus, des niveaux d'ARNm de 10 fois supérieurs aux niveaux dans les cellules non-stimulées sont atteints après 24 hrs d'exposition au TPA et se maintiennent sur toute la durée de l'expérience (8 jrs). Toutefois, l'augmentation des niveaux de protéines est retardée de 2 jours par rapport à l'augmentation maximale des niveaux d'ARNm et elle n'atteint un plateau qu'après 6 jours de stimulation au TPA (Fig. 1.8) (12).

1.8 Résumé, hypothèse et objectifs spécifiques

Contrairement à la plupart des tissus où elle est exprimée, l'enzyme PGHS-1 est présente de façon constitutive dans les plaquettes sanguines à des taux élevés, non caractéristiques de son mode d'expression de gène domestique (62;64). En catalysant l'étape limitante de la synthèse du TxA_2 , prostanoïde activateur des plaquettes et substance vasoconstrictive, PGHS-1 joue un rôle important dans l'agrégation des plaquettes (15;33). D'ailleurs, dans les plaquettes, l'activité enzymatique de PGHS-1 est la cible thérapeutique de l'Aspirin administrée de façon régulière à faible dose dans le but de réduire le risque de formation de caillots sanguins en absence de lésions (6). L'utilisation de l'Aspirin dans le traitement et la prévention de maladies cardiovasculaires a réitéré l'importance de PGHS-1 dans la thrombostase.

L'étude des mécanismes de régulation de l'expression du gène *PGHS-1* dans les plaquettes est limitée puisque les plaquettes sont des cellules sans noyau. Un moyen de

Figure 1.8: Représentation schématique du profil d'expression de l'ARNm et de la protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01 stimulées au TPA. La ligne continue représente le patron d'expression de l'ARNm de PGHS-1 et la ligne pointillée représente le profil d'accumulation de la protéine PGHS-1 dans les MEG-01 stimulées au TPA sur une période de 8 jrs (12). Les niveaux d'ARNm augmentent rapidement (1 jr) et sont maintenus tout au long de la période d'étude, tandis que l'augmentation maximale des niveaux protéique est retardée (6 jrs). Il est possible d'observer un délai d'au moins deux jours entre l'atteinte du niveau maximal d'ARNm et l'apparition de la protéine PGHS-1. Afin d'étudier le délai observé, des extraits de MEG-01 stimulées pour 1 jr et pour 4 jrs seront utilisées tout au long des expériences réalisées pour ce projet; leurs niveaux d'ARNm *PGHS-1* sont similaires, mais la protéine PGHS-1 n'est détectée que dans les cellules stimulées pour 4 jrs.



contourner cet obstacle est de travailler avec des cellules moins différenciées possédant un noyau et la machinerie traductionnelle: les mégacaryocytes (10). Étant donné leur faible disponibilité dans le corps humain et la difficulté d'établir des cultures primaires, le choix d'une lignée cellulaire de mégacaryoblastes humains isolés d'un patient leucémique s'avère, pour l'instant, l'outil idéal pour étudier l'expression du gène *PGHS-1*. Cette lignée, MEG-01, se différencie *in vitro* de façon similaire au processus de différenciation *in vivo* (11). Notre modèle *in vitro* permet l'observation de l'expression du gène *PGHS-1* dans les MEG-01 induites à se différencier par l'action du TPA (12;136).

Précédant mon arrivée au laboratoire, l'expression du gène *PGHS-1* dans les MEG-01 soumises ou non au TPA a été caractérisée. Le laboratoire a démontré que le gène *PGHS-1* était induit durant la différenciation des MEG-01 cependant, les profils d'augmentations de l'ARNm et de la protéine ont révélé des cinétiques différentes (12). Alors qu'en règle générale, dans les cellules eucaryotes, la protéine peut être détectée quelques heures après l'activation de la transcription, un délai d'au moins 2 jrs dans la synthèse protéique a été observé, ce qui suggère que suite à l'expression génique stimulée par le TPA, l'ARNm *PGHS-1* atteint et maintient un niveau maximal après 24 hrs, alors que la traduction est retardée (Fig 1.8).

Par ailleurs, même si l'augmentation rapide de l'ARNm suggère une activation transcriptionnelle du gène *PGHS-1*, nous avons concentré nos efforts sur l'activation traductionnelle ou plutôt, sur le retard traductionnel. En effet, nous supposons que dans les plaquettes, il est plus bénéfique de diminuer la synthèse de la protéine *PGHS-1*, et donc de TxA_2 , que de favoriser l'augmentation de synthèse protéique et par conséquent,

les risques d'agrégation plaquettaire non-contrôlée. Basé sur ce raisonnement, l'objectif général de mon projet de maîtrise était de tenter d'expliquer le délai observé dans l'accumulation de la protéine PGHS-1 dans notre modèle *in vitro*. **Nous avons émis l'hypothèse qu'une interaction ARN-protéine(s) dans la R3'NT pourrait expliquer le délai observé entre les accumulations d'ARNm et de protéine PGHS-1.** Plus spécifiquement, mes objectifs étaient les suivants:

- Déterminer à l'aide d'études de retardement sur gels, si une interaction ARN-protéine(s) corrélant avec l'accumulation de la protéine PGHS-1 est possible entre un élément de la R3'NT de *PGHS-1* et des extraits de MEG-01;
- Caractériser cette interaction ARN-protéine(s);
- Explorer le rôle possible d'une telle interaction ARN-protéine(s) dans le délai observé dans l'accumulation de la protéine PGHS-1.

Pour réaliser ces objectifs, nous avons utilisé des MEG-01 exposées au TPA pendant 1 jr et 4 jrs, puisque ces extraits diffèrent suffisamment dans leurs niveaux de protéine PGHS-1, mais non dans leur niveaux d'ARNm (Fig. 1.8). En effet, tel qu'observé précédemment (12), après 1 jr, l'ARNm est présent dans les cellules, mais la protéine est absente, alors qu'à 4 jrs, l'ARNm est toujours élevé et la protéine est à présent détectée par immunobuvardage Western. Ceci nous a permis de caractériser une interaction spécifique ARN-protéines qui est sensible à la durée de stimulation au TPA. Puis, afin d'examiner le rôle de cette interaction spécifique dans la traduction de la protéine, nous avons observé l'association de l'ARNm *PGHS-1* aux ribosomes et examiné l'effet d'inhibiteurs des systèmes protéolytiques sur les niveaux de protéine PGHS-1 dans les MEG-01.

2. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Culture cellulaire et traitement au TPA

Les cellules MEG-01 ont été obtenues de la compagnie ATCC. Il s'agit d'une lignée cellulaire mégacaryoblastique isolée d'un patient souffrant de leucémie mégacaryoblastique. Les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% (v/v) de sérum foetal bovin (Wisent Inc., CAN), en absence d'antibiotique, et maintenues à 37 °C dans un atmosphère humide d'air/CO₂ (19:1). Les cultures ont étéensemencées à 2×10^5 cellules/ml (20, 25 ou 50 ml) et cultivées pendant 4 jours, après quoi la population de cellules flottantes à été réajustée à 2×10^5 cellules/ml. Après 3 jours, le réajustement a été répété et 20 hrs plus tard, les cellules ont été stimulées avec ou sans TPA (16 nM). Les cellules non stimulées ont été traitées avec la même concentration de DMSO que les cellules traitées au TPA, soit 0.001% v/v. L'incubation s'est poursuivie pendant une période de 1 ou 4 jours, puis les cellules ont été récoltées, soit pour l'analyse des ARN ou des protéines, pour la mesure de l'activité enzymatique ou pour les études de retardement sur gels.

2.2 Analyse d'ARN par hybridation Northern

2.2.1 Isolation de l'ARN total

L'ARN total a été extrait des MEG-01 (20 ml) traitées avec le TPA durant 1 et 4 jours par la méthode du *Trizol* (Gibco-BRL) basée sur les instructions du fabricant. Les concentrations d'ARN total des échantillons ont été déterminées par absorbance à 260 nm.

2.2.2 Résolution sur gel et transfert

Les échantillons d'ARN total (15 µg) ont été chauffés à 55 °C pour 15 min, puis mélangés (1:1) au tampon de chargement [48% formamide, 2.1 M formaldéhyde, 1x tampon MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA), 5.3% glycérol, 0.025% Bleu de bromophénol] avant séparation (100 v, 45 min) sur gels d'agarose 1%, dénaturants en présence de formaldéhyde 0.7 M. L'ARN a ensuite été transféré sur une membrane de nylon (Biodyne B, GibcoBRL) dans un tampon 10x SSC pH 7 [1.5 M NaCl, 150 mM de citrate de sodium] pour une période de 18 hrs. Après quoi, les membranes ont été mises dans un four sous-vide à 80 °C pour 2 hrs, afin d'immobiliser l'ARN sur les membranes.

2.2.3 Hybridation et détection

Les membranes de nylon ont été pré-hybridées dans une solution de 5x SSC, 1x Denhardt, 50% formamide, 1% SDS, 10% sulfate de dextran, 20 mM Tris-Cl, pour 30 min à 42 °C avec 30 µg/ml d'ADN de sperme de harrang (Promega). L'hybridation s'est déroulée dans la même solution à 42 °C durant 20 hrs. La sonde utilisée (10^6 cpm/ml) et marquée de façon aléatoire avec du αP^{32} -dATP (Amersham, PB10204, 10 mCi/ml) à l'aide de la trousse "Prime-it II" (Stratagene), correspondait à l'ADNc de *PGHS-1* humain. Après la période d'incubation avec la sonde, les membranes ont été lavées deux fois dans des conditions de stringence faible, à la température de la pièce dans une solution de 2x SSC/0.05% SDS et ensuite une fois à 65 °C pendant 30 min dans une solution de 0.1x SSC/0.1% SDS (conditions de forte stringence). Les membranes ont été exposées et les ARN visualisés par le système "PhosphorImager" à l'aide du tomодensitomètre STORM 860 (Molecular Dynamic) et du programme "ImageQuant

5.1". La première sonde fut enlevée en bouillant pendant 2 min les membranes dans de l'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate). Puis, une sonde marquée au P^{32} correspondant à l'ADNc de *β -actine* humain a été utilisée pour contrôler la quantité d'ARN chargée dans chaque puits, suivant le même protocole d'hybridation.

2.3 Analyse protéique

2.3.1 Isolation des protéines

Après la récolte des cellules (20 ml) traitées au TPA pour 1 et 4 jours, par centrifugation à 3000 rpm (GRP centrifuge, Beckman) suivie de deux lavages au PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), celles-ci ont été lysées sur glace dans un volume de 200 μ l de Tris-Cl 0.1 M, pH 7.5 à l'aide d'un sonicateur (3 x 15 sec) (Microson). Les concentrations de protéine pour chaque échantillon ont été déterminées par la méthode de Bradford modifiée, basée sur le protocole de Bio-Rad. L'albumine de sérum bovin (BSA) fut utilisée comme étalon.

2.3.2 Immunobuvardage Western

Les échantillons protéiques (10 μ g), bouillis pendant 3 min dans le tampon de chargement [0.05 M Tris-Cl, pH 6.8, 5% 2-mercaptoéthanol, 9% Glycérol, 2.3 % (p/v) SDS, 0.1% Bleu de Bromophénol], ont été résolus par électrophorèse (BioRad Protean II mini-gel apparentus; 100 v, 1 hr) sur gels dénaturants (SDS-PAGE) [10% polyacrylamide (acrylamide:*bis*-acrylamide; 29:1), 0.1% SDS] et transférés sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) pendant 1 hr à 115 v, dans le tampon de transfert suivant: 0.04 M Tris, 0.3 M Glycine, 23% Méthanol. Les membranes ont ensuite été placées dans une solution 0.05% Tween 20/3% lait/1x TBS (*Tris Buffer Solution* [3 mM

KCl, 20 mM Tris, 140 mM NaCl]) pour une période de 2 à 16 hrs. L'anticorps primaire anti-PGHS-1 utilisé est dirigé contre les acides aminés Leu²⁷²-Gln²⁸³ de la protéine PGHS-1 humaine (gracieuseté du Dr. W.L. Smith, Michigan State University), il a été dilué dans une solution 0.05% Tween 20/1x TBS/1% lait (dilution 1:2000), incubé avec les membranes pendant 1-2 hrs et la détection s'est faite à l'aide de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la peroxidase dilué dans la même solution (dilution 1:2000) (Promega). Les membranes ont été lavées avec une solution 0.05% Tween 20/1x TBS. Les protéines ont été visualisées à l'aide d'un système de détection de chimioluminescence (Boehringer Mannheim), et photographiées par un appareil Polaroid sur des film Polapan 667 noir et blanc. Après avoir enlevé le premier anticorps (incubation de 30 min dans 100 mM 2-mercaptoéthanol/2% SDS à 60 °C), les membranes ont été réincubées avec l'anticorps anti-actine (dilution 1:2000; contrôle quantitatif) développé dans le lapin (Sigma) ou avec l'anticorps monoclonal anti-*c-myc* (Sigma), contrôl positif pour le traitement au MG-132 (voir section 2.7); anti-*c-myc* (dilution 1:2000) a été détecté avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris (dilution 1:2500) conjugué à la peroxidase (Promega). Lorsqu'indiqué, les anticorps anti-actine et anti-PGHS-1 ont été incubés simultanément. Pour confirmer l'identité de la bande, les échantillons protéiques ont été migrés parallèlement à un standard (Std) de PGHS-1 (1 µg) purifiée à partir de vésicules séminales de mouton (gracieuseté du Dr. W.L. Smith, Michigan State University).

2.3.3 Coloration à l'argent

Afin de visualiser l'ensemble des protéines composant les extraits de MEG-01 traités ou non au TPA, les extraits protéiques ont été résolus sur des gels de

polyacrylamide (10%) dénaturants qui, suite à l'électrophorèse, ont été colorés avec une préparation d'argent en solution, selon le protocole fourni avec la trousse de coloration de Bio-Rad (BioRad silver stain kit).

2.4 Mesure de l'activité enzymatique

La synthèse du thromboxane par les cellules MEG-01 intactes a été mesurée après 1 et 4 jours de stimulation au TPA. Les cellules en culture (25 ml) ont été récoltées par centrifugation et resuspendues dans 0.5 ml de RPMI 1640. Le substrat, l'acide arachidonique [$1\text{-}^{14}\text{C}$] (Amersham, CFA504, 20 $\mu\text{Ci/ml}$), à une concentration finale de 10 μM ; 42 mCi/mM, a été ajouté, et les cellules ont été incubées à 37 °C pour 30 min. Pour arrêter la réaction, les cellules ont été centrifugées pour 5 min à 1000x g (GRP centrifuge, Beckman), et le milieu a été enlevé. Les protéines ont été précipitées par l'addition de 1 volume d'acétone. Le surnageant, contenant les produits radioactifs, principalement le thromboxane B₂ (TxB₂) et l'AA inutilisé, a été acidifié avec 1 volume de 0.1 M HCl et extrait avec 3 volumes d'acétate d'éthyle/méthanol/0.2 M acide citrique (30:4:1). La phase organique a été évaporée complètement sous un jet d'azote gazeux, puis resuspendue dans la phase organique du solvant (50 μl) utilisé pour la chromatographie sur couche mince: acétate d'éthyle/2,2,4-triméthylpentane/acide acétique/H₂O (11:5:2:1). Les échantillons ont été appliqués sur une plaque de gel de silice G60 (VWR). Les produits lipidiques ont été séparés par chromatographie et détectés par exposition sur un film Kodak pour 40 hrs. Le TxB₂ radioactif a été identifié par comparaison avec un standard TxB₂ (Cayman Chemical) et quantifié par analyse densitométrique.

2.5 Analyse d'interactions ARN-protéines

2.5.1 Préparation des extraits cellulaires

Après la période d'incubation de 1 et 4 jrs avec ou sans le TPA, les cellules MEG-01 (50 ml) ont été récoltées par centrifugation et lavées deux fois avec 3 volumes de PBS (1 volume = volume de cellules culottées). Tel que décrit dans le protocole de J.D. Dignam (140), les cellules ont été lysées sur glace dans 3 volumes de tampon #1 [10 mM Tris-Cl (pH 7.5 à 25 °C), 5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF] pendant 5 min. Pour obtenir les extraits nucléaires, une fois les cellules lysées dans le tampon #1, les noyaux ont été culottés par centrifugation à 4 °C (3000 rpm, 10 min, GRP centrifuge Beckman). Le surnageant cytoplasmique a été récupéré et les noyaux ont été lysés en présence de tampon #1 supplémenté de détergent triton X-100 (1% v/v), puis centrifugés pour éliminer les débris membranaires. Ensuite, 1 volume de tampon #2 [250 mM Tris-Cl (pH 7.5 à 25 °C), 10 mM MgCl₂, 0.25 M KCl, 5 mM DTT, 5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 50% glycérol] a été ajouté aux surnagants cytoplasmiques et nucléaires obtenus. Ces extraits ont été centrifugés à 15000 rpm, 15 min à 4 °C (Avanti J-25 centrifuge, rotor JA-25-50, Beckman), puis les surnagants ont été transférés dans un nouveau tube et centrifugés une seconde fois. Les extraits ont été ensuite rapidement gelés dans un bain de glace sèche/éthanol et entreposés à -80 °C. La concentration protéique de chaque extrait a été déterminée telle que mentionnée plus haut. Suivant le protocole de Shetty S. et Idell S. (141), des extraits cytoplasmiques de MEG-01 stimulées ou non pour 4 jrs, ont aussi été préparés par homogénéisation sur glace des cellules, préalablement récoltées et lavées au PBS, dans 10 volumes du tampon suivant: 25 mM Tris-Cl, pH 7.9, 0.5 mM EDTA et 0.1 mM PMSF. Ces homogénats ont été centrifugés à 15000 rpm, 15 min à 4

°C (Avanti J-25 centrifuge, rotor JA-25-50, Beckman). Les surnageants ont été récupérés puis centrifugés à 36000 rpm pour 4 hrs à 4 °C dans une ultracentrifugeuse (rotor TLA 100.3, TL-100 ultracentrifuge, Beckman). Les différents surnageants obtenus suite à cette deuxième centrifugation ont été récupérés et utilisés comme extraits cytoplasmiques, après quantification des protéines.

2.5.2 Plasmides et transcription *in vitro* des sondes d'ARN

Les oligonucléotides formant l'insert à transcrire ont été synthétisés par la "University of Ottawa Biotechnology Research Institute". Le vecteur pGEM-3Z (Promega) a été utilisé pour les réactions de transcription *in vitro*. La stratégie de clonage élaborée pour obtenir les sondes d'ARN permet l'insertion directionnelle de la séquence conservée de la R3'NT de *PGHS-I* ainsi que la transcription des sondes d'ARN sens et antisens à partir du même plasmide. En effet, le vecteur pGEM-3Z possède des sites d'initiation de la transcription pour les polymérases T7 et SP6 (voir détails sur la figure 2.1). Le vecteur pGEM-3Z a d'abord été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *Hind III*, afin d'éliminer la majorité du site de polyclonage. Le vecteur linéaire aux extrémités cohésives a été purifié sur gel d'agarose 1% avant d'être utilisé dans la réaction de ligation. Chacun des oligonucléotides présentés dans le tableau 2.1 a été élaborée et synthétisée dans le but de permettre l'appariement des deux oligonucléotides d'une même paire (incubation à 65 °C, 5 min et 15 min sur glace) et de former un insert apte à la ligation, sans étape additionnelle, puisqu'il possède une extrémité cohésive *EcoRI* et une autre *HindIII*, complémentaires aux extrémités du vecteur pGEM-3Z pré-digéré. Chaque insert ainsi formé contient la séquence conservée de 20 nts normale ou mutée (caractères gras), les sites *EcoRI* et *HindIII* aux extrémités et le site *XhoI* (en vert)

Figure 2.1: **Stratégie de clonage de la séquence de PGHS-1 conservée dans le vecteur d'expression pGEM-3Z.** Séquence du vecteur en amont et en aval du site d'insertion montrant les extrémités cohésives créées après digestion du vecteur circulaire avec les enzymes *EcoRI* et *HindIII* (en mauve), les séquences des promoteurs T7 et SP6 (en bleu), la direction de la transcription (indiquée par la flèche) et le nucléotide en position +1 (en caractère gras noir) de chaque promoteur.

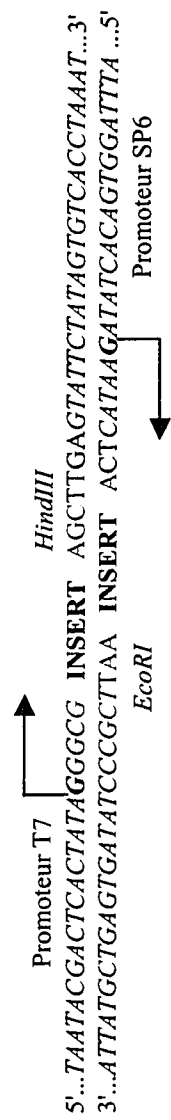


Tableau 2.1

Séquences des oligonucléotides sens et antisens utilisés comme matrice pour la transcription *in vitro* des sondes d'ARN correspondant à la séquence conservée¹ de 20 nts présente dans la R3'NT de *PGHS-1*

Sonde (ARN polymérase):	Oligonucléotides ² utilisés comme matrice pour la transcription <i>in vitro</i> des sondes d'ARN
Sens (T7)³ et Antisens⁴ (SP6)	5' AATTCCTCGAGTTCATTTTCCTGTTCAAGTAA 3' 3' GGAGCTCAAGTAAAAGGACAAGTCACTTTTCGA 5'
Antisens (T7)	5' AATTCCTCGAGTCACTGAACAGGAAAATGAAA 3' 3' GGAGCTCAGTGACTTGTCTTTTACTTTTCGA 5'
Mutant #1 (T7)	5' AATTCCTCGAGTACGTCTACTTATCCTGAGTA 3' 3' GGAGCTCATGCAGATGAATAGGACTCATTCGA 5'
Mutant #2 (T7)	5' AATTCCTCGAGTTCGTCTTCCTGTTCAAGTAA 3' 3' GGAGCTCAAGCAGAAGGACAAGTCACTTTTCGA 5'
Mutant #3 (T7)	5' AATTCCTCGAGTTCAGTACCTGTTCAAGTAA 3' 3' GGAGCTCAAGTGACTGGACAAGTCACTTTTCGA 5'
Mutant #4 (T7)	5' AATTCCTCGAGTTCATTGACCTGTTCAAGTAA 3' 3' GGAGCTCAAGTAACTGGACAAGTCACTTTTCGA 5'
Mutant #5 (T7)	5' AATTCCTCGAGTTCAGTACCTGTTCAAGTAA 3' 3' GGAGCTCAAGTGAATGGACAAGTCACTTTTCGA 5'
Sens-20nt.⁵ (T7)	5' TGTAATACGACTCACTATAGG 3' 3' ACATTATGCTGAGTGATATCCAAGTAAAAGGACAAGTCACT 5'
Antisens-20nt.⁵ (T7)	5' TGTAATACGACTCACTATAGG 3' 3' ACATTATGCTGAGTGATATCCAGTGACTTGTCTTTTACTT 5'

¹ Les caractères gras correspondent à la séquence conservée de *PGHS-1*; les nucléotides en caractère rouge indiquent les mutations.

² Pour les 7 premières paires d'oligonucléotides, l'extrémité cohésive en 5' de l'insert formé, représente le site *EcoRI* et l'extrémité 3' représente le site *HindIII* utilisés pour la ligation de l'insert dans le vecteur pGEM-3Z pré-digéré avec ces mêmes enzymes (Fig. 2.1). La séquence en vert correspond au site *XhoI* utilisé pour confirmer la présence de l'insert.

³ Lorsque l'ARN polymérase T7 est utilisée, le plasmide pGEM-3Z-PGHS-1-R3'NT contenant l'insert approprié est linéarisé avec *HindIII*, avant de procéder à la transcription.

⁴ Le même plasmide utilisé pour la sonde sens sert comme matrice d'ADN pour la préparation de cette sonde antisens; cette-fois-ci, le plasmide est digéré avec *EcoRI* et l'ARN polymérase SP6 est utilisée.

⁵ Matrice utilisée pour la transcription de la sonde d'ARN ne contenant que la séquence conservée. La séquence double-brin correspond à la séquence minimale du promoteur de l'ARN polymérase T7 (en bleu) nécessaire à la transcription. La sonde résultante contient les 2 premiers G du promoteur suivi de la séquence de 20 nts de *PGHS-1*.

utilisé pour l'identification des clones positifs; l'enzyme *XhoI* (Boehringer Mannheim) ne possède pas de site de restriction dans le vecteur pGEM-3Z. La ligation de l'insert s'est fait en présence de la *T4 ligase* suivant le protocole fourni avec la trousse de *Rapid DNA ligation* de Boehringer Mannheim. Pour la transformation par choc thermique, des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α ou JM109 fournies avec le plasmide pGEM-3Z, ont été utilisées. Une maxi préparation d'ADN plasmidique des clones positifs a été réalisée afin d'obtenir une matrice d'ADN de bonne qualité et en quantité suffisante pour la transcription *in vitro*. Les sondes sens, antisens et mutées ont été transcrites du vecteur pGEM-3Z-hPGHS-1-R3'NT correspondant, linéarisé avec *HindIII* ou *EcoRI* selon que la polymérase (20 U/ μ l) utilisée était l'ARN polymérase T7 (NEB) ou l'ARN polymérase SP6 (NEB), respectivement. Ces réactions de transcription (15 μ l) se sont déroulées à 37 °C dans le tampon de transcription fourni avec l'enzyme, pendant 2 hrs en présence de la matrice d'ADN appropriée (~1 μ g), de 6.5 μ l de [α -P³²]UTP (Amersham, PB20383, 20 mCi/ml), de 0,5 mM de chaque ATP, CTP, GTP et 0,05 mM UTP et d'inhibiteur de ribonucléase (1 U/ μ l, Boehringer Mannheim). Après digestion de la matrice d'ADN avec une déoxyribonucléase (1 U/ μ l, *DNase/RNase free*, GibcoBRL), les sondes marquées ont été récupérées, selon le protocole de Wilusz J (142), par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) et une précipitation à l'éthanol (2.5 volumes) en présence d'acétate d'ammonium (2 M) et d'ARNt (0.5 μ g/ μ l, GibcoBRL). Les sondes radioactives obtenues ont été directement utilisées dans les études de retardement sur gels après dilution à 200 000 cpm/ μ l ou à 1 pmol de sonde/réaction, basé sur leur activité spécifique respective. Les transcrits formés avec l'ARN polymérase T7 mesuraient 37 nts alors que la sonde antisens obtenue avec l'ARN

polymérase SP6 mesurait 41 nts. La longueur des transcrits a été vérifiée sur gels de polyacrylamide 10%/7 M urée, par comparaison à la migration, en parallèle, d'oligonucléotides d'ADN de longueur similaire à la sonde attendue. La position des colorants bleu de bromophénol (BB) et xylène cyanol (XC) migrant à la distance d'un oligonucléotide d'ADN de 10 et de 55 nts, respectivement, sur un gel de polyacrylamide 10%/7 M urée (143) a aussi permis de vérifier la longueur des transcrits obtenus. Brièvement, des aliquots des réactions de transcription ont été mélangés (1:1) au tampon de chargement [20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 8M Urée, 1 mM EDTA, 0.025% BB, 0.025% XC], puis chauffés à 92 °C, 4 min avant la résolution sur gel. Les gels ont été exposés sur un film Kodak afin de détecter les transcrits radioactifs, alors que les sondes non-marquées ont été détectées par exposition aux rayons UV des gels colorés au bromure d'éthidium.

La sonde froide pour l'étude de compétition a été synthétisée selon le même protocole en absence d'UTP radioactif; la quantité d'UTP froid a été ajusté à 0.5 M comme pour les autres NTPs. Deux sondes sens et antisens correspondant uniquement à la séquence de 20 nts ont également été générées par la même méthode de transcription *in vitro* à l'exception qu'aucun clonage n'a été nécessaire. Deux oligonucléotides appariés ensemble et possédant la séquence minimale double brin du promoteur de l'ARN polymérase T7 et la séquence conservée de PGHS-1, ont été utilisés comme matrice d'ADN. Ces paires oligonucléotides sont présentées au bas du tableau 2.1. Les sondes générées mesuraient 22 nts (séquence de 20 nts conservée + GG provenant du promoteur) et leur tailles ont été vérifiées sur gels de polyacrylamide 12%/7 M urée, en parallèle à la migration d'un oligonucléotide d'ADN de 21 nts.

2.5.3 Études de retardement sur gels avec sonde d'ARN (ARN-EMSA)

Les réactions d'interactions ARN-protéines ont été réalisées en présence de 10-20 µg d'extrait protéique de MEG-01 et de 200 000 cpm de transcrit marqué au P^{32} , incubés dans un volume total de 20 µl, à la température de la pièce dans un tampon d'interaction 1x [20 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM DTT, Tween 20[®] 0.2% (w/v), 30 mM KCl] durant 15 min pour permettre la formation de complexes. De l'héparine a été ajouté à différentes concentrations finales (1, 2.5, ou 5 µg/µl) et l'incubation s'est poursuivie pour un autre 10 min à la température de la pièce. Les échantillons ont ensuite été placés sur glace puis irradiés sous une lampe UV pendant 10 min à une distance de 6 cm de la source lumineuse (UV stratalinker[™] 2400 chamber, Stratagene). Les complexes formés ont ensuite été analysés par électrophorèse (Hoefer SE 410 Sturdier slab vertical gel apparatus) sur des gels de polyacrylamide 5% (29:1) natifs, après l'addition du tampon de chargement [50% glycérol/H₂O DEPC] aux réactions d'ARN-EMSA. L'électrophorèse s'est déroulé dans un tampon TBE 0.5x pour environ 2 hrs à 300 v à la température de la pièce. La visualisation des complexes s'est faite par autoradiogramme. D'autrepart, afin de déterminer la taille des protéines fixées à la sonde d'ARN, après irradiations aux UV, le tampon de chargement SDS a été ajouté aux réactions d'interaction qui furent chauffées à 80 °C pour 2-3 min et ensuite résolues sur des gels de polyacrylamide (29:1) 8.5% dénaturants (SDS-PAGE). Ces gels furent analysés par autoradiographie.

Pour certaines expériences, les extraits cellulaires ont été préincubés pour 10 min à la température de la pièce avec des ARN compétiteurs, tels qu'un excès de sonde sens froide ou différents homoribopolymères (Amersham), avant l'addition de la sonde sens

marquée au P^{32} . D'autres traitements, tels que l'addition de protéinase K (USB) ou de SDS aux extraits ou la dénaturation par la chaleur des extraits ou de la sonde, ainsi que la digestion de la sonde par les ribonucléases IA (Amersham) et T1 (Boehringer Mannheim) ont également été appliqués afin de confirmer la nature protéine-ARN des complexes formés.

2.5.4 Isolation et analyse sur gels dénaturants du complexe ARN-protéines spécifique

Pour l'analyse du complexe identifié comme spécifique à la séquence conservée de 20 nts, par les expériences de retardement sur gels natifs, les bandes de gel correspondant à ce complexe ont été excisées puis, les composantes protéiques ont été éluées dans une solution de 50 mM $(NH_4)_2HCO_3$ contenant 0.001% SDS et 0.02 M PMSF, à 4 °C durant une période de 16 hrs avec faible agitation. Après l'élution, le volume a été concentré à 40 μ l, à l'aide de dispositifs de filtration par centrifugation (Centricon[®] and Ultrafree[®]-MC YM-10, Millipore). Les composantes protéiques du complexe ont été résolues sur un gel d'électrophorèse contenant un gradient 4-19% de polyacrylamide (29:1) dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines furent d'abord visualisées avec une coloration au SYPRO[®] Tangerine (Molecular Probes), nécessitant l'utilisation du tododensitomètre STORM 860 (Molecular Dynamics) pour l'observation des protéines. Ensuite, les gels ont été séchés puis exposés sur un écran phosphore (Molecular Dynamics) pour permettre la détection des protéines interagissant directement avec la sonde d'ARN marquée, à l'aide du système "PhosphorImager" et du tododensitomètre STORM 860 (Molecular Dynamics). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le #SM0431 de MBI Fermentas.

2.6 Analyse de l'attachement polysomale

2.6.1 Extraction et fractionnement de l'ARN total

Les différentes fractions ribosomales ont été obtenues par centrifugation sur une solution de sucrose 30%, tel que décrit par Garcia-Sanz JA (144). Brièvement, les MEG-01 (50 ml) stimulées ou non avec le TPA pour 1 et 4 jrs ont été récoltées et lavées comme précédemment, puis lysées sur glace pour 15 min dans 1 ml de tampon d'extraction [10 mM HEPES, pH 7.5, 3 mM $MgCl_2$, 40 mM KCl, 5% glycerol, 0.5% (v/v) tergitol NP-40 et 400 U/ml inhibiteur de ribonucléases (Promega)]. Après une brève centrifugation pour éliminer les noyaux, 150 μ g/ml de cyclohexamide, 1 mM de PMSF, 5 mg/ml d'héparine et 20 mM DTT ont été ajouté au surnageant. Ensuite, 600 μ l des différents extraits cytoplasmiques obtenus ont été appliqués sur la solution de 2.4 ml de sucrose (30% p/v) dans le tampon d'extraction supplémenté avec 0.5 mg/ml d'héparine, 10 mM de DTT, et 100 μ g/ml de cycloheximide. Les échantillons de 3 ml ont été centrifugés à 130,000 x g, 2 hrs, à 4 °C (ultracentrifugeuse Beckman L8-55M, rotor SW-55Ti) et 5 fractions de 600 μ l ont été récupérées à partir du haut du tube. Après extraction avec 1 volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et précipitation à l'isopropanol (0.85 volume), l'ARN total de chaque fraction a été dissout dans 10-20 μ l d' H_2O DEPC. La quantité d'ARN pour chaque fraction a été déterminée par la lecture de l'absorbance à 260 nm. Pour l'analyse des ARNr de 18S et de 28S, des aliquots de chaque fraction obtenue ont été incubés à 55 °C durant 15 min, puis mélangés au tampon de chargement et résolus sur un gel d'agarose 1%, tel que décrit à la section 2.2.2. Les ARNr ont été visualisés par coloration des gels au bromure d'éthidium suivie d'une exposition aux rayons UV.

2.6.2 Buvardage, hybridation et détection

Des aliquots de chaque fraction ribosomale ont été incubés dans 3 volumes de solution dénaturante [66% formamide, 2.6 M formaldéhyde, 13% tampon MOPS (0.2M MOPS, 0.5M sodium acetate, 0.01M EDTA)] pendant 15 min à 65 °C, ensuite mis sur glace et dilués avec 2 volumes de 20x SSC glacial. Les échantillons furent appliqués sur des membranes de nylon (BiodyneB, GibcoBRL) par succion, dans des fentes individuelles, à l'aide d'un appareil Hybri-Slot™ (LifeTechnology, Gibco BRL Apparatus). Une fois que les échantillons furent filtrés au travers des fentes, 1 ml de 10x SSC a été ajouté dans chaque fente puis laissé absorbé complètement. L'appareil fut démonté et l'ARN immobilisé sur les membranes, tel que décrit précédemment. De même, la préhybridation et l'hybridation avec la sonde d'ADNc de PGHS-1 marquée au P³² ont été réalisées telles que décrites ci-haut. L'ARNm de PGHS-1 a été visualisé à l'aide du système "PhosphorImager" et du tododensitomètre STORM 860 (Molecular Dynamics) et quantifié par le programme "ImageQuant 5.1".

2.7 Analyse de l'inhibition des systèmes protéolytiques

Les cellules MEG-01 (20 ml) ont été cultivées comme décrit précédemment et traitées ou non avec du TPA pour 1 et 4 jours. Les différents inhibiteurs ont été ajoutés aux cellules, 8 hrs avant la récolte, aux concentrations finales suivantes: MG-132 (Sigma): 100 µM, chloroquine (Sigma): 100 µM et PD150606 (Calbiochem): 20 µM. Le MG-132 et le PD 150606 ont été préalablement dissouts dans du DMSO à une concentration de 100 mM et 20 mM, respectivement; la chloroquine a été dissoute à 100 mM dans de l'eau stérilisée. L'obtention des extraits protéiques, leur résolution sur gels

dénaturants et la détection immunochemique des protéines PGHS-1, actine et *c-myc* dans les différents extraits obtenus ont été réalisées telles que décrites à la section 2.3.

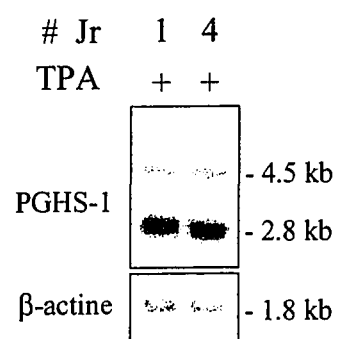
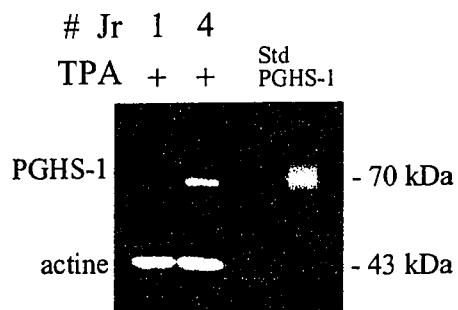
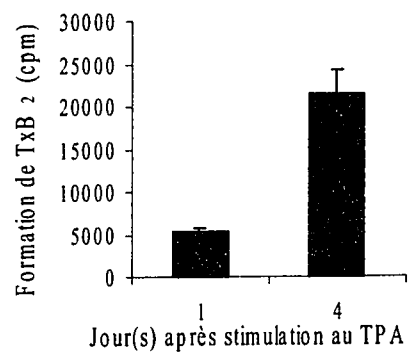
3. RÉSULTATS

3.1 Délai dans l'augmentation des niveaux de protéine PGHS-1 dans les MEG-01 stimulées au TPA

Nous avons démontré précédemment que dans les cellules MEG-01 non-stimulées, l'ARNm *PGHS-1* (2.8 et 4.5 kb) pouvait être détecté par la méthode d'hybridation Northern (12). Toutefois, les niveaux demeurent faibles et constants durant la période d'étude de 8 jrs (12). Cependant, dans notre système *in vitro*, après 1 jr de TPA, les ARNm *PGHS-1* de 2.8 kb et de 4.5 kb atteignent leurs niveaux maximaux qui sont environ 10 fois supérieurs aux niveaux d'ARNm *PGHS-1* dans les cellules non-stimulées et le maintiennent pour une durée d'au moins 8 jrs (Fig. 1.8). En effet, lorsque les MEG-01 sont stimulées avec le TPA (16 nM) pour 1 et 4 jrs, les transcrits *PGHS-1*, 2.8 et 4.5 kb, sont détectés par hybridation Northern dans des extraits d'ARN total (Fig. 3.1A). Dans ces deux extraits, les niveaux d'ARNm *PGHS-1* étaient augmentés de façon similaire suite à des durées d'exposition de 1 et de 4 jrs au TPA, et le transcrit de 2.8 kb était le plus abondant des deux, conformément à la littérature (62). La détection de l'ARNm de β -actine (1.8 kb) a servi de contrôle quantitatif; niveaux constants dans les deux extraits.

À l'opposé de l'ARNm, aucune protéine PGHS-1 n'est détectée par immunobuvardage Western, dans les MEG-01 traitées au TPA pendant 1 jr (Fig. 3.1B), malgré les niveaux élevés d'ARNm *PGHS-1*. Cependant, 4 jrs après l'addition de TPA, les niveaux de protéine PGHS-1 ont augmenté, tel qu'observé précédemment (12). La bande à 43 kDa correspond à l'actine qui est utilisée comme contrôle de chargement.

Figure 3.1: Niveaux d'ARNm, de protéine et d'activité de l'enzyme PGHS-1 après stimulation au TPA. **A)** Autoradiogramme représentatif d'une hybridation Northern d'ARN total (15 µg) extrait des MEG-01 stimulées au TPA (16 nM) pour 1 et 4 jrs. Les sondes utilisées correspondent aux ADNc de *PGHS-1* et de *β-actine* humains. Les transcrits de 2.8 kb et de 4.5 kb de *PGHS-1* ont été détectés après 1 jr de stimulation et leur niveau ont été maintenus après 4 jrs de stimulation. La détection du transcrit de *β-actine* (1.8 kb) a été utilisée comme contrôle de chargement. **B)** Détection de *PGHS-1* par immunobuvardage Western, comparant les niveaux de protéine retrouvés dans les cellules MEG-01 traitées avec le TPA pour 1 jr et 4 jrs. Après résolution des extraits protéiques (10 µg) sur gels dénaturants et de leur transfert sur membranes, celles-ci furent incubées simultanément avec l'anti-*PGHS-1* et l'anti-actine, utilisé comme contrôle interne. En opposition aux niveaux d'ARNm *PGHS-1* observés en A), la protéine *PGHS-1* n'a été détectée que dans l'extrait stimulé au TPA pour 4 jrs. Std *PGHS-1*: standard protéique *PGHS-1* (1 µg). **C)** L'activité *PGHS-1* dans les cellules stimulées au TPA pendant 4 jrs est augmentée par rapport aux cellules stimulées pour 1 jr. L'activité est une mesure de la formation de TxB_2 radioactif à partir d'AA exogène marqué au C^{14} . Ceci a indiqué que l'enzyme *PGHS-1*, augmentant après 4 jrs de stimulation au TPA, était active. Tous ces résultats sont représentatifs de trois expériences.

A)**B)****C)**

Pour confirmer que la protéine PGHS-1 induite par le TPA était biologiquement active, les cellules MEG-01 stimulées ont été incubées avec de l'AA marqué au C^{14} . Ceci a permis de mesurer les niveaux de TxB_2 (métabolite stable du TxA_2) radioactif synthétisé par les cellules sur une période de 30 min. La figure 3.1C montre que l'augmentation des niveaux de protéines PGHS-1 dans les cellules traitées pour 4 jrs est accompagnée par une capacité accrue de produire le TxB_2 , indiquant que l'enzyme PGHS-1 qui catalyse l'étape limitante de cette synthèse, est fonctionnelle. Ce résultat confirmait que le TPA était capable d'induire une protéine PGHS-1 enzymatiquement active dans les MEG-01.

Les augmentations non-parallèles de l'ARNm et de la protéine semblaient suggérer une régulation post-transcriptionnelle du gène *PGHS-1* favorisant, par exemple, l'accumulation de l'ARNm *PGHS-1* dans le cytoplasme, sous une forme inactive pour la traduction. Les expériences suivantes avaient pour but de comprendre le délai observé entre les accumulations d'ARNm et de protéine PGHS-1, dans les MEG-01 traitées au TPA.

3.2 Identification d'une séquence conservée dans la R3'NT de *PGHS-1*

L'observation des faibles niveaux de protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01 stimulées pour 1 jr, malgré les niveaux d'ARNm élevés, et déjà à leur maximum, peut être reliée à un faible taux de synthèse protéique ou à un taux élevé de dégradation. La possibilité que le gène *PGHS-1* soit régulé post-transcriptionnellement, nous a conduites à la recherche d'un élément de régulation se trouvant dans la R3'NT de l'ARNm *PGHS-1*. En effet, la R3'NT est très souvent impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle

des gènes. De plus, les éléments régulateurs retrouvés dans la R3'NT sont généralement conservés entre les espèces, et il a été rapporté que la R3'NT de *PGHS-1* était particulièrement bien conservée (62). Par conséquent, les séquences R3'NT connues, c'est-à-dire les 1000 premières bases après le codon d'arrêt, de 4 espèces mammifères ont été alignées et analysées pour la présence de séquence consensus, par le programme informatique "ClustalW 1.8" (annexe I). Cette comparaison de séquence R3'NT entre la souris, le rat, l'humain et le mouton, nous a permis d'identifier une séquence conservée de 20 nts. Cette séquence de 20 nts (séquence 20-nt) était la plus longue séquence parfaitement conservée dans la R3'NT, et était localisée au 491^{ième} nt après le codon d'arrêt chez l'homme, au 509^{ième} nt chez le mouton et au 662^{ième} nt chez la souris et le rat (Fig. 3.2A). Par ailleurs, l'analyse de la structure secondaire du transcrit de 2.8 kb de l'ARNm de hPGHS-1 (Fig. 3.3A), ainsi que des autres espèces, a permis de constater que la séquence 20-nt était localisée dans une région formant un bras s'étendant vers l'extérieur de la structure secondaire de l'ARNm *PGHS-1* (Fig. 3.3). Chez l'humain, les 7 premiers nucléotides de la séquence conservée (UUCAUUU) étaient libres, tandis que neuf des treize nucléotides suivants entraient dans la formation d'appariements Waston-Crick (Fig. 3.3A, agrandissement). Cette structure rappelle les régions de contact ARN-protéines retrouvées dans certains ARN (145;146), et favorise notre hypothèse d'une interaction protéique dans cette région.

Figure 3.2: Identification d'une séquence de 20 nts parfaitement conservée dans la R3'NT de *PGHS-1* de 4 espèces mammifères. **A)** À l'aide des programmes d'analyse "ClustalW 1,8" et "Boxshade 3.21", les 1000 premiers nucléotides après le codon d'arrêt de la R3'NT de *PGHS-1* chez la souris, le rat, l'humain et le mouton ont été comparés et alignés selon l'homologie des séquences. Cette analyse a permis l'identification d'une séquence consensus de 20 nucléotides, la plus longue séquence entièrement conservée (boîte noire). Les symboles: * représentent les nucléotides conservés. Cette conservation de séquence entre les espèces nous porte à croire que la séquence de 20 nts pourrait être impliquée dans un mécanisme de régulation. **B)** Séquence des sondes sens et antisens transcrites à partir d'un seul vecteur et utilisées dans les études de retardement sur gels. La séquence en caractères gras correspond à la séquence 20-nt de *PGHS-1*, les caractères en bleu indiquent les nucléotides provenant du promoteur de l'ARN polymérase T7 ou SP6 et les séquences en mauve correspondent aux sites de restriction *EcoRI* et *Hind III* utilisés pour le clonage dans le vecteur pGEM-3Z, tel que décrit dans la section *Méthodes Expérimentales* 2.5.2 et sur la figure 2.1. Le site de restriction *XhoI* qui a servi à identifier les clones positifs est indiqué en vert.

A)

	# nt après TGA	Séquence 20-nt
Souris	657	AUUGGUUCAAUUUCCUGUUCAGUGA
Rat	657	AUUGGUUCAAUUUCCUGUUCAGUGA
Humain	486	UUUGAUUCAAUUUCCUGUUCAGUGA
Mouton	506	G---AAUUCAAUUUCCUGUUCAGUGA
Consensus	721	*****

B)

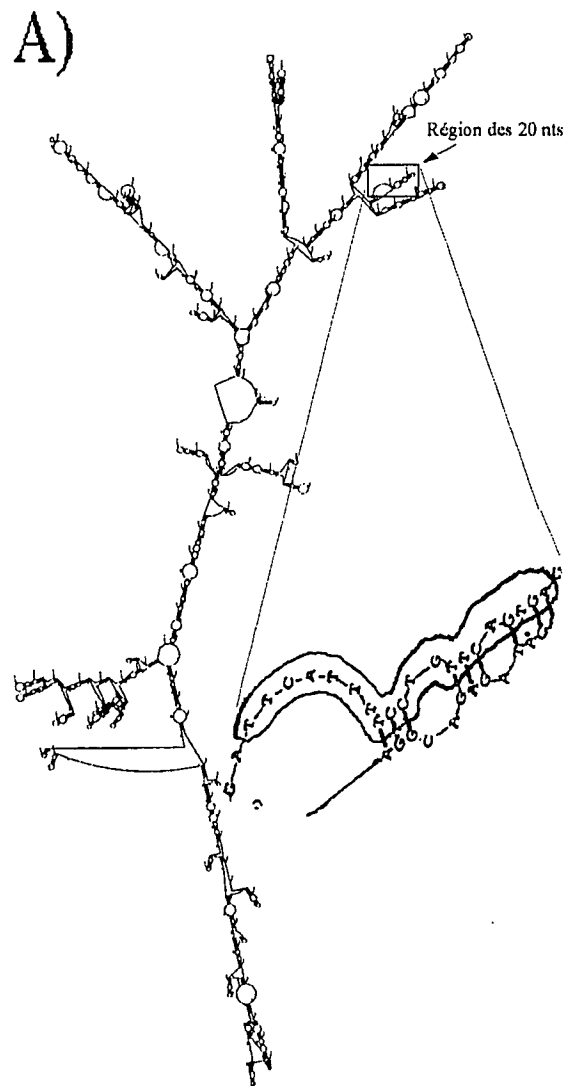
sens:

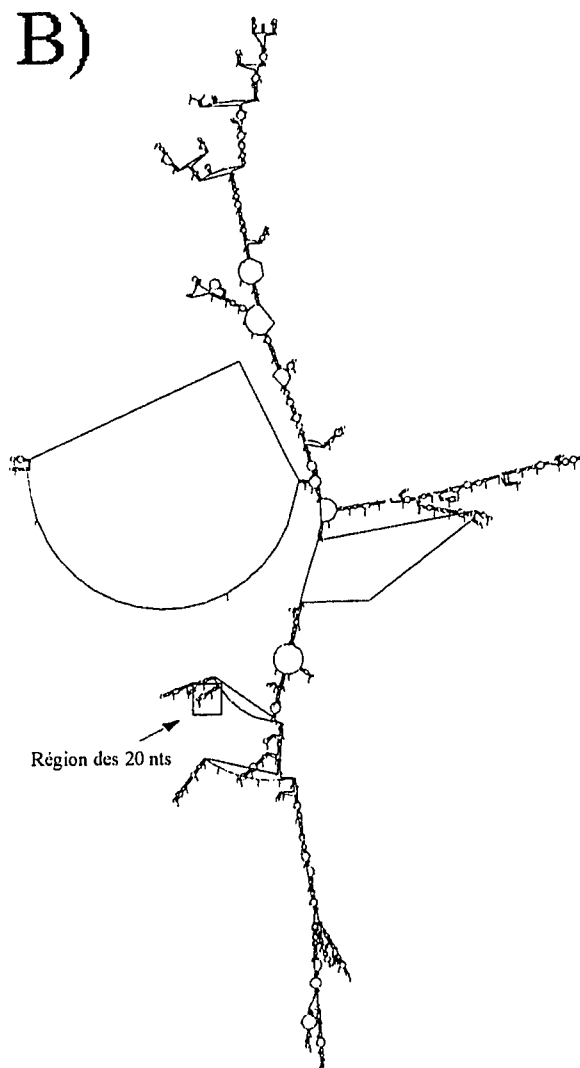
5' GGGCGAAUUCUUCGAGUUCAUUUUCCUGUUCAGUGAA 3' (avec T7)

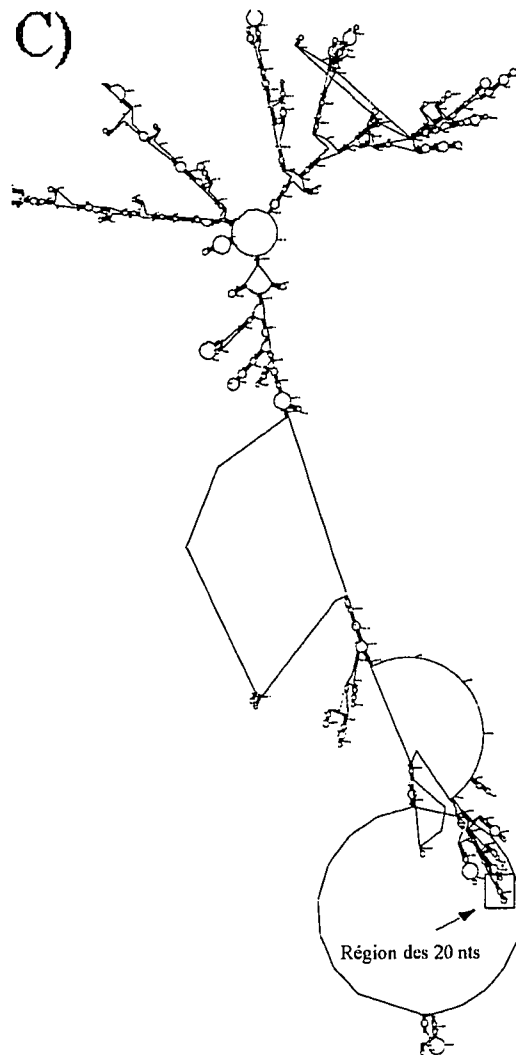
Antisens:

5'GAAUACUCAAGCUUUCACUGAACAGGAAAAUGAACUCGAGG 3' (avec SP6)

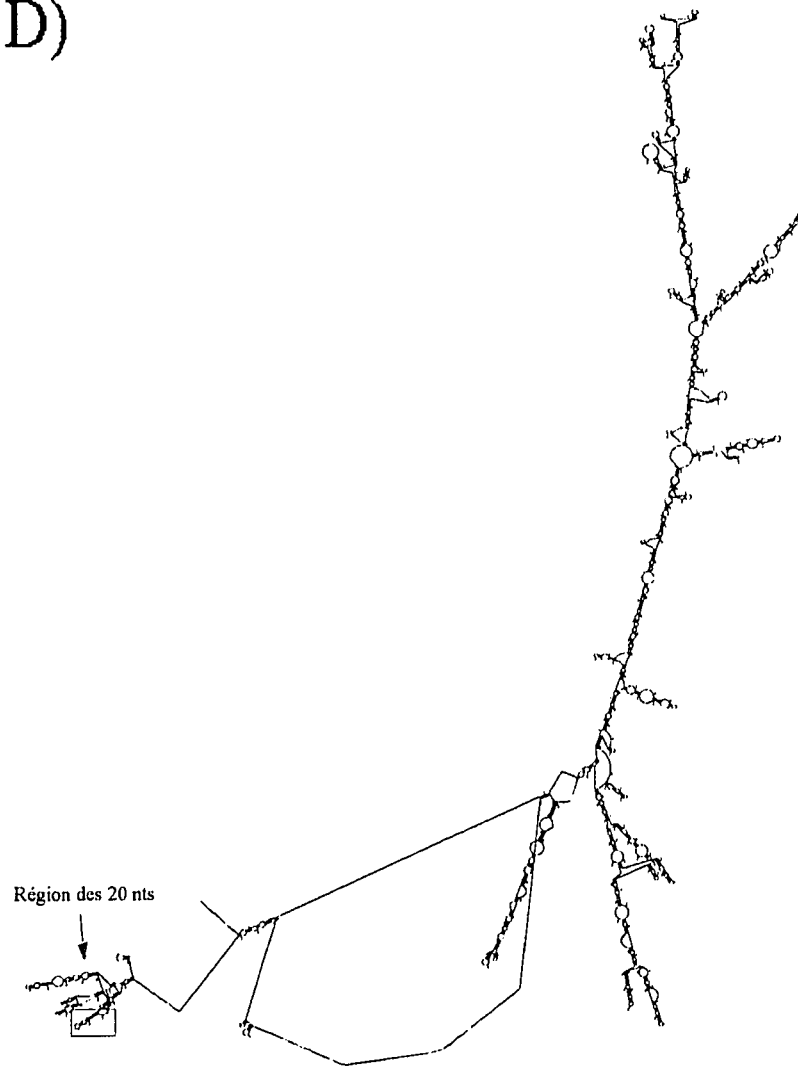
Figure 3.3: **Structure secondaire de l'ARNm *PGHS-1* de 4 espèces mammifères.** Le programme informatique "RNAstructure 3.5" permet l'étude de structure secondaire d'ARN basé sur l'état énergétique le plus favorable. Cette analyse a montré que la séquence 20-nt faisait partie d'une structure secondaire qui a l'allure d'un bras court s'étendant vers l'extérieur de l'ARNm replié, et ce chez les quatre espèces. Cette structure est en faveur d'une interaction entre des protéines régulatrices et la séquence 20-nt. **A)** Structure secondaire du transcrit de 2.8 kb chez l'homme ($\Delta G = -891.7$) et agrandissement de la région des 20 nts. Structure secondaire du transcrit de 2.8 kb chez **B)** le rat ($\Delta G = -904.1$), **C)** la souris ($\Delta G = -884.3$) et **D)** le mouton ($\Delta G = -936.1$); la région des 20 nts est encadrée.







D)



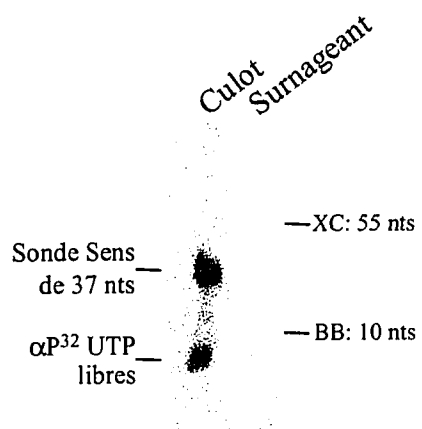
3.3 Identification d'interactions dépendantes de la durée d'exposition au TPA impliquant la séquence conservée de *PGHS-1* et des extraits cellulaires de MEG-01

Afin de tester l'hypothèse que des facteurs agissant en *trans* pourraient fixer l'élément-*cis* conservé de l'ARNm de *PGHS-1*, la séquence 20-nt identifiée a été clonée dans le vecteur de transcription pGEM-3Z, à partir duquel une sonde sens de 37 nts a été transcrite par l'ARN polymérase T7 (Fig. 3.2B). La figure 3.4A montre la sonde sens de 37 nts telle qu'obtenue par transcription *in vitro* et précipitation selon le protocole décrit par Wilusz J (142), puis résolue sur gel de polyacrylamide/urée. La transcription a donné un produit majoritaire, dont la position correspondait à un transcrit de 37 nts, telle que proposée par sa migration en regard de celles des colorants BB (10 nts) et XC (55 nts). Afin de vérifier l'efficacité de la précipitation de la sonde radioactive, 10^6 cpm provenant du culot et du surnageant ont été migrés en parallèle; la sonde n'est détectée que dans le culot. Des études de retardement sur gels avec sonde d'ARN (ARN-EMSA) ont été utilisées pour repérer des piARNm (protéine interagissant avec l'ARNm) fixant la séquence 20-nt. Les transcrits marqués ont été incubés avec des extraits cellulaires, cytoplasmiques ou nucléaires, provenant soit de MEG-01 non-stimulées ou stimulées au TPA, pour 1 et 4 jrs (-TPA1jr; +TPA1jr; -TPA4jrs; +TPA4jrs). Les complexes formés ont été analysés sur des gels de polyacrylamide 5% natifs. En premier lieu, des ARN-EMSA ont été réalisées dans différentes conditions de stringence afin d'évaluer la capacité de la sonde à former des complexes et de déterminer lesquels des extraits cytoplasmiques ou nucléaires formaient les complexes les plus intenses. Pour varier la stringence dans une réaction d'ARN-EMSA, l'héparine est généralement utilisée. L'héparine est un polymère chargé négativement, et qui, par des interactions charge-

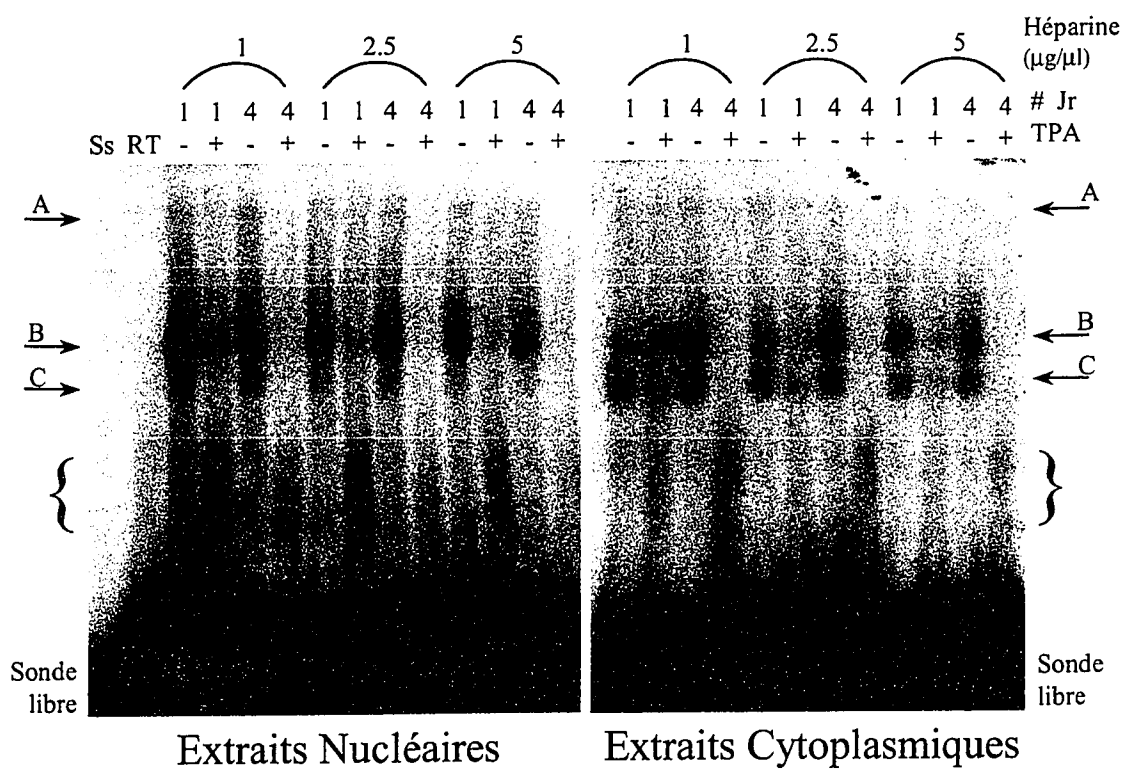
Figure 3.4: Études de retardement sur gels avec la sonde sens, en présence d'extraits cytoplasmiques ou nucléaires et de concentrations croissantes d'héparine.

A) La taille et la qualité de la sonde sens ont été vérifiées sur gels de polyacrylamide 10%/urée 7M visualisés par autoradiographie. Les colorants bleu de bromophénol (BB:~10 nts) et xylène cyanol (XC:~55 nts) ont servis de points de repère. La sonde sens migre à l'endroit prévu, soit 37 nts, et constitue le produit majeur de transcription. Après précipitation, la sonde sens est retrouvée dans le culot, mais non dans le surnageant. **B)** La sonde sens représentant la séquence conservée de PGHS-1 a été incubée avec des extraits (10 µg) nucléaires (à gauche) ou cytoplasmiques (à droite) de MEG-01 stimulées ou non au TPA pour 1 et 4 jrs. Pour chaque groupe de quatre extraits, les concentrations d'héparine suivantes ont été testées: 1, 2.5 et 5 µg/µl. La sonde sens (Ss) libre de 37 nts migre au bas du gel de polyacrylamide 5%. Aucun complexe ne se forme dans la réaction témoin (RT) qui contient tous les éléments de la réaction d'ARN-EMSA, sauf l'extrait cellulaire. Trois complexes définis sont observés (A, B et C) alors qu'un ensemble de complexes plus diffus est observé au bas du gel (accolades). À l'exception de cet ensemble, aucun complexe n'est formé avec l'extrait +TPA-4jrs. Les complexes A, B et C sont formés majoritairement avec les extraits de cellules non-stimulées et aussi avec l'extrait +TPA-1jr et résistent à l'addition d'héparine (5 µg/µl). Ces observations s'appliquent aux extraits nucléaires et cytoplasmiques, mais les complexes sont plus intenses avec les extraits cytoplasmiques. Les complexes ont été visualisés par autoradiographie. Ces résultats sont représentatifs de cinq ARN-EMSA.

A)



B)



charge, attire les protéines majoritairement chargées positivement dans ces conditions réactionnelles (pH 7.6). Ainsi, l'héparine libère la sonde des protéines qui s'y fixent sans spécificité de séquence. L'optimisation de la concentration d'héparine est importante; il faut diminuer le bruit de fond sans affecter la formation des complexes ARN-protéines spécifiques. Trois concentrations d'héparine ont été testées, soit 1, 2.5 et 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les résultats des ARN-EMSA avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques sont présentés à la figure 3.4B. De façon générale, sauf des variations d'intensité, les complexes observés avec les extraits nucléaires étaient les mêmes qu'avec les extraits cytoplasmiques. Nous avons observé au moins trois complexes définis (A, B et C) ainsi que des complexes moins définis et migrant au bas du gel (indiqués par les accolades). Le plus lourd des trois premiers complexes (A) était peu intense, mais résistait tout de même à la présence d'héparine. Par contre, les deux complexes migrant au milieu du gel (B et C) étaient intenses, bien définis et résistants à l'ajout de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'héparine. Les complexes A, B, et C étaient présents avec les extraits de cellules non-stimulées de façon plus intense qu'avec l'extrait +TPA-1jr, ce qui suggérait qu'ils contenaient davantage de piARNm capables de fixer la séquence 20-nt. La principale caractéristique de ces ARN-EMSA était que, même dans des conditions de faible stringence (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'héparine), aucun des complexes A, B et C ne se formaient lorsque la sonde sens était mise en présence d'un extrait cellulaire +TPA-4jrs. Les seuls complexes observés avec cet extrait étaient ceux désignés par les accolades, cependant ces derniers n'étaient pas aussi intenses et bien définis que les complexes B et C et résistaient moins à l'héparine.

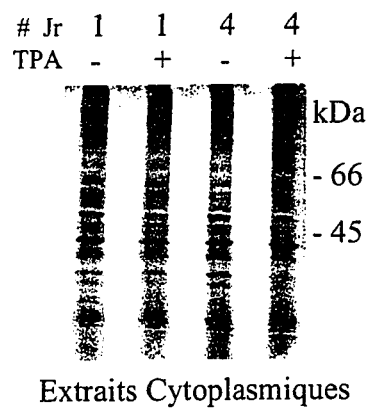
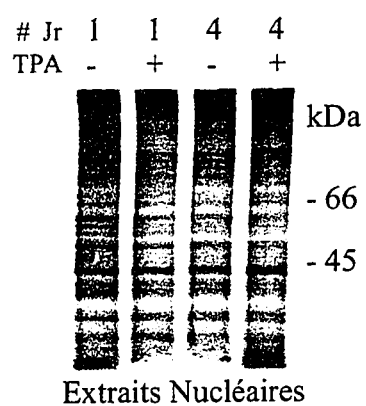
Pour vérifier que l'absence de formation de complexe avec l'extrait +TPA-4jrs n'était pas causé par la dégradation des protéines de l'extrait ou par une plus faible

quantité de protéines dans cet extrait, les quatre différents extraits, cytoplasmiques et nucléaires, ont été résolus sur gels d'électrophorèse en présence de SDS. Ces gels ont ensuite été colorés à l'argent afin de visualiser l'ensemble des protéines de chaque extrait (Fig. 3.5A). La qualité et la quantité des protéines de l'extrait +TPA-4jrs étaient comparables à celles des autres extraits et n'étaient probablement pas mises en cause dans l'absence des complexes A, B et C observée dans les réactions de ARN-EMSA réalisées avec cet extrait. Ceci suggère que les protéines entrant dans la formation des complexes A, B et C seraient absentes ou du moins, empêchées d'interagir avec la séquence 20-nt, dans les cellules stimulées pour 4 jrs.

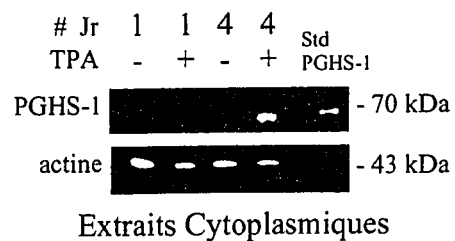
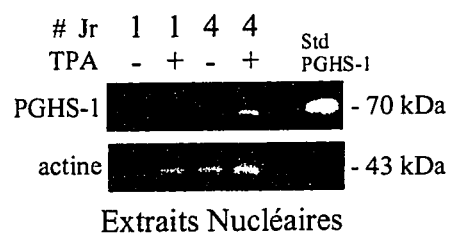
Nous nous sommes davantage intéressées au complexes B et C parce que leur formation semblait être dépendante de la durée du traitement au TPA et qu'ils étaient plus intenses et mieux définis que le complexe A. Afin d'établir une corrélation entre la formation des complexes B et C et la présence de la protéine PGHS-1 dans les MEG-01, nous avons détecté par immunobuvardage Western les niveaux de PGHS-1 dans les extraits cellulaires utilisés pour les ARN-EMSA (Fig. 3.5 B). Tel que prévu, la protéine PGHS-1 n'est détectée que dans l'extrait +TPA-4jrs, dans le noyau et dans le cytoplasme. Par conséquent, l'absence d'interaction entre la séquence 20-nt et l'extrait +TPA-4jrs corrélait avec des niveaux augmentés de protéine PGHS-1 dans cet extrait cellulaire. Par ailleurs, l'actine étant une protéine du cytosquelette, sa présence dans les extraits dits nucléaires semblait indiquer que la séparation noyau/cytoplasme lors de l'extraction n'avait pas été optimale et pourrait s'expliquer principalement par la lyse incomplète des cellules dans le tampon hypotonique utilisé (section 2.5.1). Par conséquent, des cellules non-lysées ont probablement été culottées avec les noyaux lors

Figure 3.5: Analyse du contenu protéique des extraits cellulaires utilisés dans les études de retardement sur gels. **A)** Afin de contrôler la qualité de l'extrait +TPA-4jrs, les quatre extraits (10 µg) nucléaires (à gauche) et cytoplasmiques (à droite) ont été résolus sur gels d'électrophorèse (10%) dénaturants, puis visualisés par une coloration à l'argent. Dans les deux cas, la qualité et la densité protéique de l'extrait +TPA-4jrs se comparent à celles des trois autres extraits. L'absence de complexe ne semble pas être causé par une dégradation prononcée des protéines dans cet extrait. **B)** Détection des protéines PGHS-1 et actine (contrôle interne) par immunobuvardage Western, dans les extraits (10 µg) nucléaires (à gauche) et cytoplasmiques (à droite) stimulés ou non avec le TPA pour 1 et 4 jrs, et utilisés dans les ARN-EMSA. La protéine PGHS-1 n'est détectée que dans l'extrait +TPA-4jrs, comme prévu. Cette augmentation des niveaux de PGHS-1 dans l'extrait +TPA-4jrs est corrélée avec l'absence des complexes A, B et C, tel que visualisé à la figure 3.4B. Inversement, la formation des complexes A, B et C correspond à l'absence de PGHS-1 dans les MEG-01 non-stimulées et stimulées pour 1 jr. Std PGHS-1: 1 µg. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

A)



B)



de la première centrifugation qui suivait la lyse cellulaire. Il serait donc plus adéquat de parler d'extraits cytoplasmiques enrichis nucléaires plutôt que d'extraits exclusivement nucléaires.

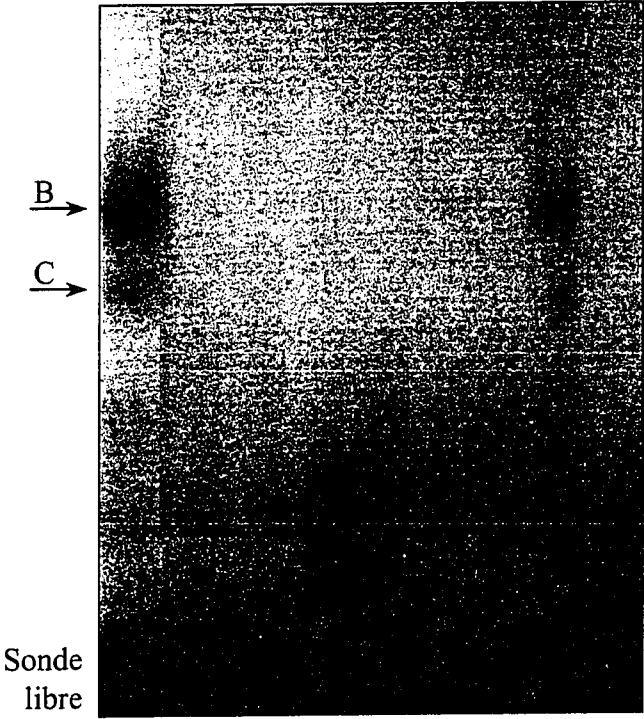
Basé sur les résultats obtenus à la figure 3.4B, nous avons déterminé que la concentration d'héparine utilisée serait de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sauf si spécifié autrement. Nous avons opté pour les extraits cytoplasmiques, plutôt que nucléaires, étant donné l'observation faite ci-haut concernant la méthode d'extraction des protéines du noyau. De plus, l'extrait cytoplasmique favorisait davantage la formation des complexes B et C, comme en témoigne leur intensité sur la figure 3.4B, en particulier avec l'extrait +TPA-1jr. Les prochains ARN-EMSA ont donc été réalisés avec des extraits cytoplasmiques et avaient pour but de vérifier la nature et la spécificité des complexes B et C.

3.4 Confirmation de la nature ARN-protéines des complexes observés

Avant de vérifier la spécificité des complexes B et C, nous avons tout d'abord confirmé la nature ARN-protéines des complexes formés en présence de la sonde de 37 nts et des extraits cytoplasmiques de MEG-01, à l'aide de différents traitements appliqués, soit sur l'extrait cytoplasmique, soit sur la sonde d'ARN, avant de les incuber ensemble dans les réactions d'ARN-EMSA. Ces résultats sont présentés à la figure 3.6. La réaction-contrôle faite avec la sonde sens de 37 nts en présence d'un extrait cytoplasmique provenant de cellules non-stimulées n'ayant subi aucun traitement, est montrée dans le premier puits; nous y distinguons les complexes B et C. Le puits #2 contient la sonde sens de 37 nts seule, migrant au bas du gel sous forme libre. Comme

Figure 3.6: Les complexes observés sont constitués d'ARN et de protéines isolées des MEG-01. La sonde sens de 37 nts ou l'extrait cytoplasmique de MEG-01 non-stimulées a été traité tel que décrit ci-contre avant leur addition à la réaction d'ARN-EMSA en présence d'héparine (5 µg/µl). Puits: #1: contrôle positif pour la réaction de liaison avec l'extrait inaltéré (10 µg); les complexes B et C sont formés; #2: la sonde sens de 37 nts en absence d'extrait protéique; aucun complexe n'est formé, #3: contrôle négatif pour la réaction de liaison avec la BSA (10 µg); aucun complexe n'est formé, puits #4-7: dégradation de l'extrait, avant l'incubation avec la sonde, soit par protéinase K (0,5 mg/ml) [K], protéinase K (2.5 mg/ml) + SDS (0,1%) [K/S], SDS (1%) [S] ou chaleur (85 °C, pour 15 min.) [C]; la formation des complexes est abolie; puits #8-9: dénaturation de la sonde d'ARN par la chaleur (70 °C, pour 5 min) [C] ou par une digestion avec les ribonucléases IA/T1 (1 U/µl) [D]; formation de complexes avec la sonde chauffée seulement. Autoradiogramme représentatif de trois expériences indépendantes.

				Extrait				Sonde	
Traitement:	-	-	-	K	K/S	S	C	C	D
BSA:	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MEG-01:	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9



contrôle négatif de liaison, la BSA a été mélangée avec la sonde sens (puits #3); aucun complexe n'est observé.

Pour débiter les traitements, l'extrait a été digéré avec la protéinase K, seule ou en présence de SDS, avant d'être incubé avec la sonde (puits #4 et #5). Les protéines de l'extrait ont aussi été dénaturées avec du SDS ou par la chaleur, puis mélangées avec la sonde (puits #6 et #7). Chacun de ces traitements empêchait la formation des complexes, confirmant que des protéines en faisaient partie. Dans un deuxième temps, nous avons altéré la sonde, soit par chaleur ou par digestion avec des ribonucléases. Il semblerait que lorsque la sonde est chauffée avant d'être incubée avec les protéines, les complexes puissent encore se former (puits #8). Ce résultat supporte la possibilité que la formation du complexe soit davantage dépendante de la séquence que de la structure secondaire. Par contre, la sonde pré-digérée avec les ribonucléases T1 et IA, et incubée avec l'extrait protéique n'a pas permis la formation des complexes (puits #9) suggérant qu'une sonde de 37 nts incomplète ou dégradée, ou même les αP^{32} UTP libres, ne formeraient pas de complexes avec les protéines de l'extrait. De ces derniers résultats, nous pouvons conclure que les complexes identifiés plus tôt étaient bien constitués de la sonde d'ARN sens de 37 nts et de facteurs protéiques isolés des MEG-01 non-stimulées.

3.5 Identification d'un complexe sensible au TPA dont la formation est dépendante de la présence de la sonde sens

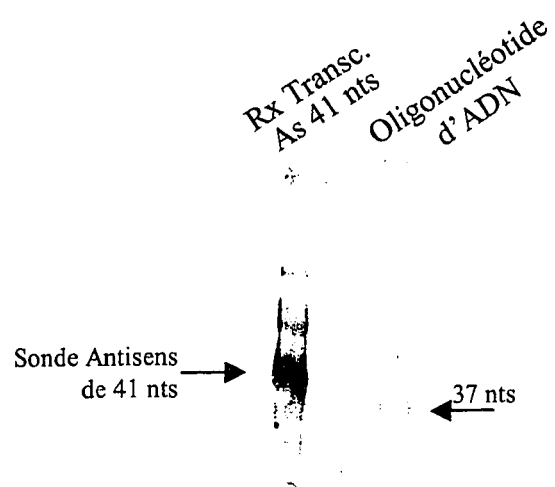
Le rôle de la séquence 20-nt dans les interactions observées précédemment a été confirmé par des ARN-EMSA dans lesquelles la sonde sens de 37 nts fut remplacée par une sonde antisens. Ainsi, pour s'assurer que les complexes B et C observés dépendaient

bien de la séquence 20-nt pour leur formation, nous avons testé leur capacité à être formés en présence d'une sonde antisens. Dans cette première tentative de déterminer l'importance de la séquence conservée dans la formation des complexes, nous avons tiré profit du fait que le vecteur utilisé comme matrice d'ADN possédait les promoteurs de transcription T7 et SP6, situés de chaque côté de l'insert représentant la séquence 20-nt (Fig. 2.1). La sonde antisens utilisée fut donc générée avec l'ARN polymérase SP6 (Fig 3.2B). Une sonde de 41 nts a été produite en raison de la position plus distante, par rapport au site de polyclonage, du nucléotide +1 dérivé du promoteur SP6 comparativement au nucléotide +1 dérivé du promoteur T7. Le produit de la réaction de transcription a été vérifié sur gel de polyacrylamide/urée (Fig. 3.7A). Une bande majeure a été détectée qui était de la taille espérée pour la sonde antisens, telle que comparée avec un oligonucléotide d'ADN de 37 nts.

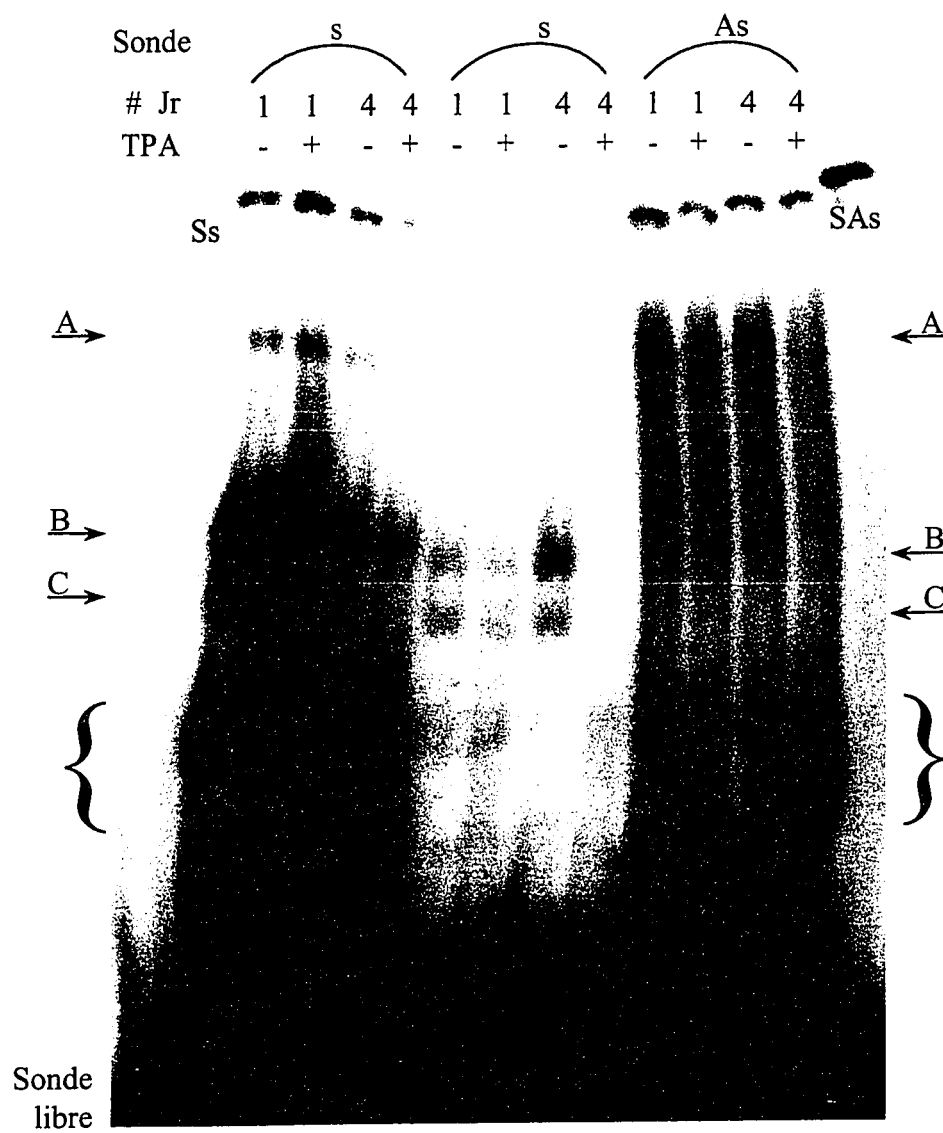
Lorsque des réactions ARN-EMSA étaient réalisées avec la sonde antisens de 41 nts, mise en présence d'extraits cytoplasmiques de MEG-01 stimulées ou non avec le TPA pour 1 et 4 jrs et de 5 µg/µl d'héparine (Fig. 3.7B, à droite), tout comme avec la sonde sens, les complexes formés avec la sonde antisens étaient sensibles à la durée d'exposition au TPA et ne se formaient pas avec l'extrait cytoplasmique +TPA-4jrs. Nous avons observé que les complexes A, B et ceux en accolades, formés avec la sonde sens (Fig. 3.7B, au centre et à gauche), étaient capables d'être formés avec l'antisens. Ceci nous a indiqué que la formation des complexes A et B n'étaient pas dépendante de la séquence 20-nt. De ces résultats d'ARN-EMSA, le plus intéressant fut de noter que le complexe C était le seul, parmi les complexes sensibles à l'exposition au TPA (A, B et C), à ne pas se former en présence de cette sonde antisens et ce, avec aucun des quatre

Figure 3.7: Comparaison des complexes formés avec les sondes sens et antisens. A) Sonde d'ARN antisens obtenue par transcription avec l'ARN polymérase SP6, migrée sur gel de polyacrylamide 10%/urée 7M et visualisée par coloration au bromure d'éthidium. Le produit de transcription attendu, une sonde de 41 nts, correspond au produit majeur observé dont la taille a été estimée par comparaison à un oligonucléotide d'ADN de 37 nts de longueur. **B)** ARN-EMSA visualisés par autoradiographie et représentatifs de trois expériences. Les quatre réactions de gauche ont été réalisées avec la sonde sens en absence d'héparine afin de favoriser la formation de complexes avec les protéines des extraits cytoplasmiques (10 µg) tandis que les huit réactions suivantes contiennent de l'héparine (5 µg/µl): au centre, ARN-EMSA avec la sonde sens; à droite, ARN-EMSA avec la sonde antisens. La formation du complexe C avec la sonde sens est sensible à la durée de stimulation au TPA: peu importe la concentration d'héparine, il est absent avec l'extrait TPA-4jrs. De plus, il n'est pas formé avec la sonde antisens en présence d'aucun des 4 extraits; sa formation semble donc spécifique à la sonde sens. Ss: sonde sens libre (37 nts) et SAs: sonde antisens libre (41 nts).

A)



B)



extraits, ce qui suggérait que sa formation était spécifique à la séquence de la sonde sens. D'autrepart afin de ne pas restreindre d'aucune façon la formation de complexes avec la sonde sens, nous avons réalisé des ARN-EMSA avec chacun des extraits cytoplasmiques en absence d'héparine (Fig. 3.7B, à gauche). Dans ces conditions de faible stringence, non seulement l'intensité des complexes était augmentée, mais il était possible d'observer le complexe B avec l'extrait +TPA-4jrs; le complexe C n'était toujours pas observé. Ceci renforce le choix du complexe C comme complexe d'intérêt dont la formation, spécifique à la sonde sens, est sensible à la durée d'exposition au TPA et inversement corrélée avec l'augmentation des niveaux de protéine PGHS-1 (Fig. 3.5B, à droite). Pour l'ensemble de ces raisons, les expériences suivantes visent à caractériser davantage le complexe C.

3.6 Spécificité de la séquence conservée de 20 nts

Dans la section précédente, nous avons démontré que la sonde sens de 37 nts était nécessaire à la formation du complexe C; ce dernier était absent en présence de la sonde antisens de 41 nts. Toutefois, afin de pallier aux différences, autres que la séquence de PGHS-1 conservée, entre la sonde sens et la sonde antisens utilisées dans les expériences décrites ci-haut, nous avons fabriqué un second vecteur dont l'insert correspondait à la séquence antisens elle-même (Tableau 2.1). Ceci a permis de comparer l'habileté de deux sondes d'ARN similaires à former des complexes avec des extraits de MEG-01 non-stimulées. En effet, la nouvelle sonde antisens, tout comme la sonde sens, fut transcrite par l'ARN polymérase T7, donc avec la même efficacité. De plus, la nouvelle sonde antisens avait la même taille, soit 37 nts, et les mêmes sites de restriction

introduits dans sa séquence que la sonde sens. La seule distinction entre ces deux sondes était donc la séquence d'intérêt, c'est-à-dire la séquence 20-nt orientée en direction opposée (Fig. 3.8A). Comme indiqué sur la figure 3.8B, les ARN-EMSA réalisées en présence de la nouvelle sonde antisens (As-T7, à droite) ne permettait toujours pas la formation du complexe C, alors que ce dernier était présent avec la sonde sens (s, à gauche). Ce résultat appuie notre observation précédente que le complexe C dépend de la sonde sens pour sa formation.

Finalement, pour s'assurer que les sites de restriction utilisés pour le clonage de l'insert dans le vecteur de transcription et, par conséquent, incorporés dans la séquence de la sonde (Fig. 2.1 et 3.2B), n'étaient pas impliqués dans la fixation des piARNm, nous avons modifié la matrice de transcription. En effet, au lieu d'utiliser un vecteur linéarisé contenant l'insert à transcrire, la matrice d'ADN fut constituée de deux oligonucléotides, dont l'appariement, tel que présenté au bas du tableau 2.1, résultait en la formation du promoteur minimal double brin de l'ARN polymérase T7, suivi de la séquence 20-nt simple brin. Ces réactions de transcription pour les sondes sens et antisens ont donné lieu à des transcrits de 22nts (Fig. 3.9A): séquence 20-nt précédée des nucléotides +1 et +2 du promoteur T7 (GG). La taille de ces transcrits a été vérifiée sur gels de polyacrylamide/urée, en parallèle avec un oligonucléotide d'ADN de 21 nts, et visualisée par coloration au bromure d'éthidium (Fig. 3.9B). Les deux sondes sens de 22 et de 37 nts ont aussi été migrées en parallèle sur un gel de polyacrylamide/urée, comme montré en retrait sur la figure 3.9C, à droite.

Ensuite, ces transcrits de 22 nts ont servi de sondes dans des ARN-EMSA réalisées avec des extraits cytoplasmiques de MEG-01 non-stimulées, en présence d'une

Figure 3.8: **Études de retardement sur gels avec la sonde antisens transcrite par l'ARN polymérase T7.** **A)** Séquence des sondes sens et antisens transcrites avec l'ARN polymérase T7 (même légende qu'à la figure 3.2). Les deux sondes mesurent 37 nts et contiennent les mêmes sites de restriction ayant servi au clonage. **B)** Comparaison des complexes formés avec la sonde sens et la sonde antisens dont la seule distinction est l'orientation de la séquence conservée de *PGHS-1*. Le complexe C, indiqué par la flèche, n'est formé qu'en présence de la sonde sens. Ces ARN-EMSA ont été réalisées avec des extraits cytoplasmiques (20 µg) de cellules non-stimulées en présence d'héparine (2.5 µg/µl), et visualisées par autoradiographie. Ces observations sont représentatives de trois essais indépendants.

A)

sens: 5' GGGCGAAUCCUCGAGUUCAUUUCCUGUUCAGUGAA 3' (avec T7)

Antisens: 5' GGGCGAAUCCUCGAGUCACUGAACAGGAAAAUGAAA 3' (avec T7)

B)

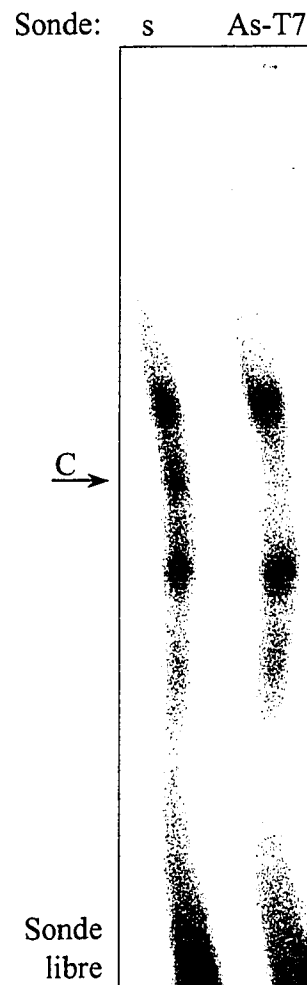
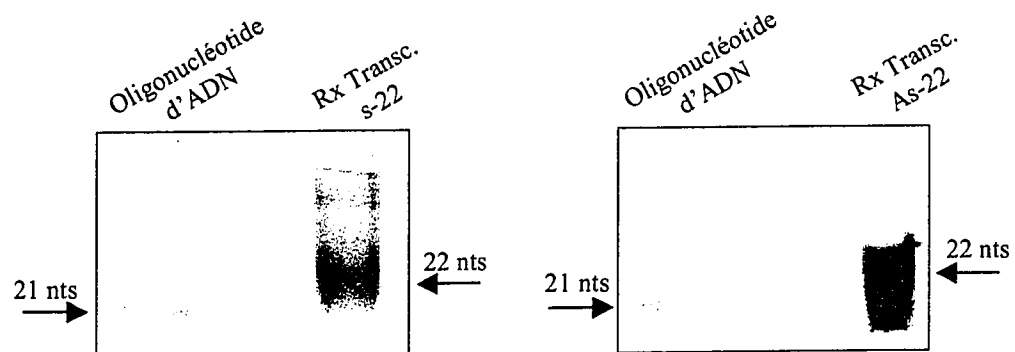


Figure 3.9: Spécificité de la séquence 20-nt dans la formation du complexe C. **A)** Séquences des sondes sens et antisens de 22 nts correspondant à la séquence de *PGHS-1* conservée, sans aucun site de restriction ajouté. **B)** Vérification de la qualité des réactions de transcription et de la taille des sondes migrées parallèlement à un oligonucléotide d'ADN de 21 nts sur des gels de polyacrylamide 12%/urée 7M, colorés au bromure d'éthidium. Sonde sens-22, à gauche et sonde antisens-22, à droite. **C)** ARN-EMSA réalisées avec les sondes sens et antisens de 22 nts en présence d'extraits non-stimulés (10 µg) et de différentes concentrations d'héparine: 0, 2.5 et 5 µg/µl. Les complexes B et C sont formés avec la sonde sens de 22 nts, même à fortes concentrations d'héparine alors que seul le complexe B est formé avec la sonde antisens de 22 nts lorsque la concentration d'héparine est plus grande ou égale à 2.5 µg/µl d'héparine. À titre de comparaison, la sonde sens de 37 nts libre a été chargée sur le gel. En retrait, les deux sondes sens de 22 et 37 nts migrées sur un gel polyacrylamide 10%/urée 7M, visualisé par autoradiographie. Ces expériences ont été reproduites trois fois.

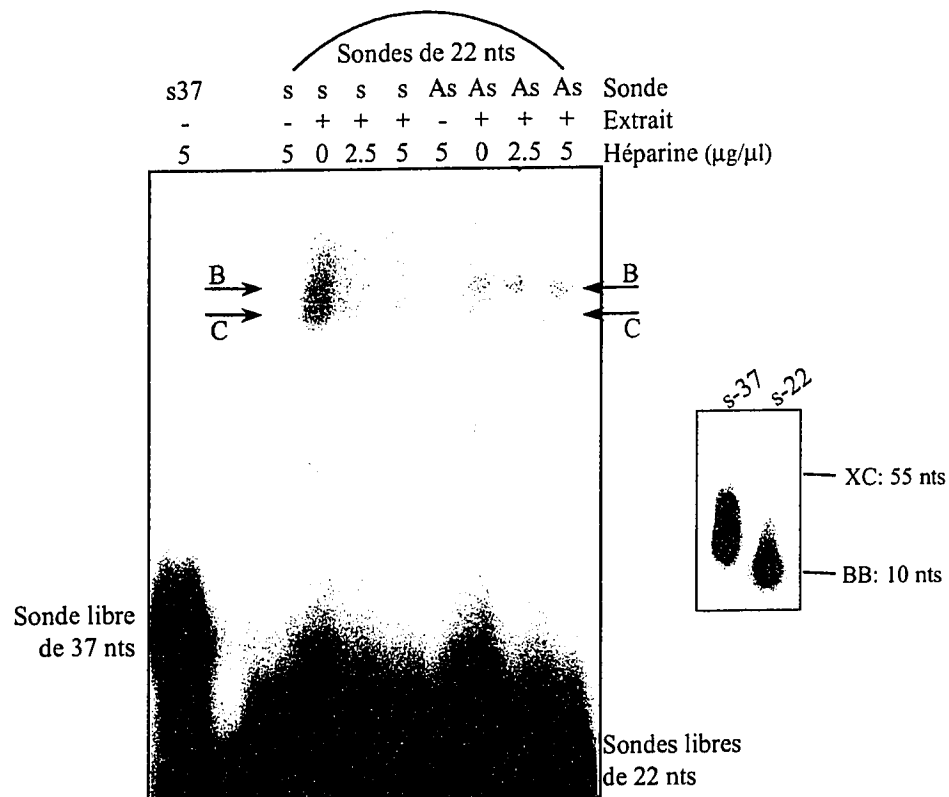
A)

s-22: 5'GGUUCAUUUCCUGUUCAGUGA3'
 As-22: 5'GGUCACUGAACAGGAAAAUGAA3'

B)



C)



concentration croissante d'héparine (Fig. 3.9C). Comme les réactions d'ARN-EMSA ont été migrées moins longtemps, afin de conserver les sondes de 22 nts dans les gels, les complexes B et C furent moins résolus. La position de la sonde de 37 nts, habituellement migrée jusqu'au bas du gel, en témoigne. Avec la sonde sens de 22 nts, il a été possible de distinguer les complexes B et C dans toutes les conditions d'héparine testées. Pour ce qui est des ARN-EMSA avec l'antisens, les résultats ont montré que les complexes B et C étaient formés dans des conditions de faible stringence (0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'héparine), toutefois, comme montré sur les figures 3.7B et 3.8B, seul le complexe B était formé avec l'antisens en présence d'une concentration d'héparine de 2,5 et 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ces ARN-EMSA ont démontré que les sites de restriction n'étaient pas impliqués dans l'interaction avec des facteurs cytoplasmiques provenant de cellules MEG-01 non-stimulées et que la formation du complexe C, dépendante de la sonde sens de 37 nts, pouvait aussi avoir lieu avec une sonde ne contenant que la séquence conservée orientée dans la direction 5'3'. Suite à ces observations, nous avons établi que la formation du complexe C était spécifique à la séquence 20-nt.

3.7 Identification de nucléotides importants dans la formation du complexe ARN-protéine(s) spécifique

Par la suite, nous avons réalisé des études de compétitions avec des ARN non marqués, d'une part avec une sonde homologue à la sonde sens de 37 nts et d'autre part avec des homoribopolymères. Pour ces ARN-EMSA, des extraits cytoplasmiques de cellules non-stimulées ont été incubés avec chacun des compétiteurs d'ARN pendant 10 min avant l'ajout de la sonde sens de 37 nts marquée. Les expériences de compétition

avec la sonde homologue ont confirmé que le complexe C était formé de la séquence 20-nt (Fig. 3.10). L'ajout d'un excès molaire croissant de sonde froide à la réaction de liaison a diminué progressivement la formation de ce complexe. Par contre, la formation du complexe B fut aussi compétitionnée, ceci n'était pas surprenant étant donné que la sonde sens permettait tout de même la formation de ce complexe. Toutefois la spécificité de liaison des protéines du complexe B à la sonde sens est moins importante que celles du complexe C, tel que démontré par leur fixation à la sonde antisens (Fig. 3.7-3.9). Par ailleurs, nous avons noté que la séquence conservée était riche en résidus uridines. Par conséquent, pour vérifier leur importance dans la formation du complexe C, les extraits cytoplasmiques de MEG-01 ont été incubés avec des quantités croissantes de ribonucléotides, soit poly(U), poly(C) ou poly(A). Tel que montré sur la figure 3.11, la formation du complexe spécifique C était compétitionnée par l'addition de poly(U), en quantité aussi faible que 10 ng, et complètement abolie par une quantité supérieure de poly(U). Cependant, les ribonucléotides poly(C) ou poly(A) n'ont pas eu cet effet drastique sur la formation du complexe C. La formation du complexe B ne semblait pas significativement affecté par l'ajout de poly(U) ou de poly(C), alors que la compétition avec le poly(A) a semblé avoir diminué la formation des deux complexes, B et C, de façon proportionnelle. Les piARNm du complexe C semblaient donc se fixer de préférences à des séquences riches en résidus uridines. Ceci est en accord avec le fait que la moitié des nucléotides de la séquence conservée 20-nt sont des U, c'est à dire que 10 des 13 résidus U présents dans la sonde de 37 nts sont concentrés dans la séquence de PGHS-1 (Fig. 3.2).

Figure 3.10: **ARN-EMSA en présence d'un excès de sonde sens froide.** Compétition de la formation du complexe spécifique C par l'addition de quantités croissantes (0x to 1000x excès molaire) d'une sonde sens homologue non-marquée aux extraits cytoplasmiques de MEG-01 non-stimulées (20 µg), avant l'incubation avec la sonde sens de 37 nts marquée et l'héparine (2,5 µg/µl). Ces résultats supportent la participation de la séquence 20-nt dans la formation du complexe C (indiqué par la flèche) et sont représentatifs de trois expériences de compétition indépendantes. Ss: sonde sens 37 nts seule.

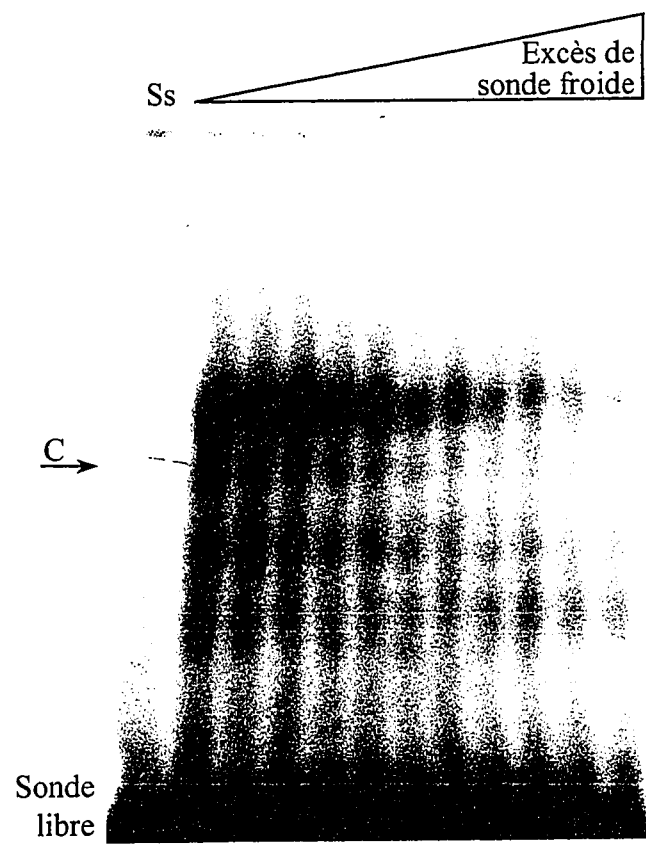
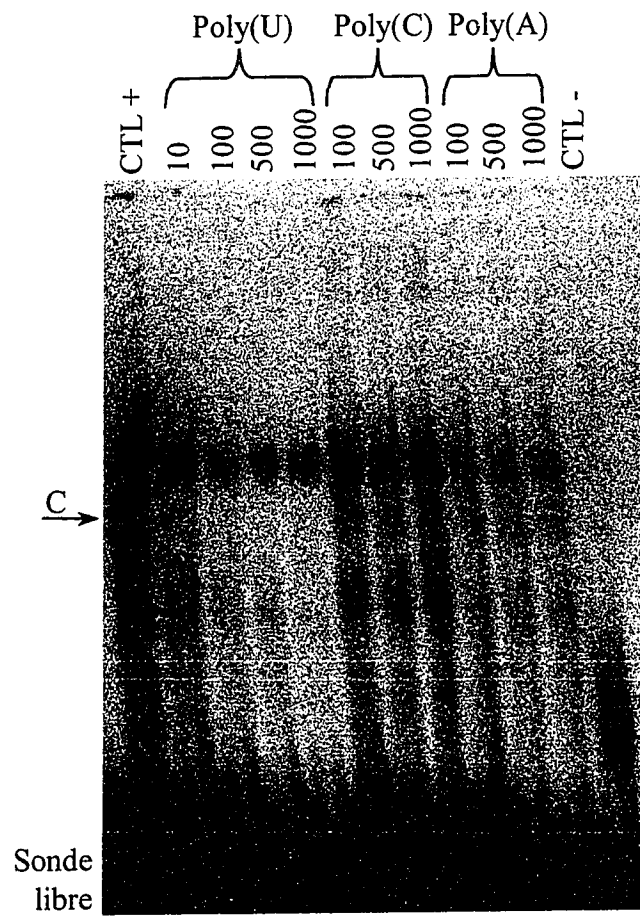


Figure 3.11: Les résidus uridines de la séquence 20-nt sont importants dans la formation du complexe spécifique. Les extraits cytoplasmiques de MEG-01 non-stimulées (20 µg) ont été incubés avec la quantité indiquée (ng) de chacun des homoribopolymères suivants: poly(U), poly(C) ou poly(A), avant l'addition de la sonde sens de 37 nts. L'héparine (2,5 µg/µl) a été ajouté aux réactions de liaison. Les complexes ont été visualisés par autoradiographie. Ces ARN-EMSA ont été répétés trois fois. En présence de poly(U), la formation du complexe C spécifique est abolie, tel qu'indiqué par la flèche. Ctl +: contrôle positif pour les réactions de liaison, sans compétiteur ajouté; Ctl -: contrôle négatif pour les réactions de liaison avec un extrait +TPA-4jrs; complexes B et C absents.



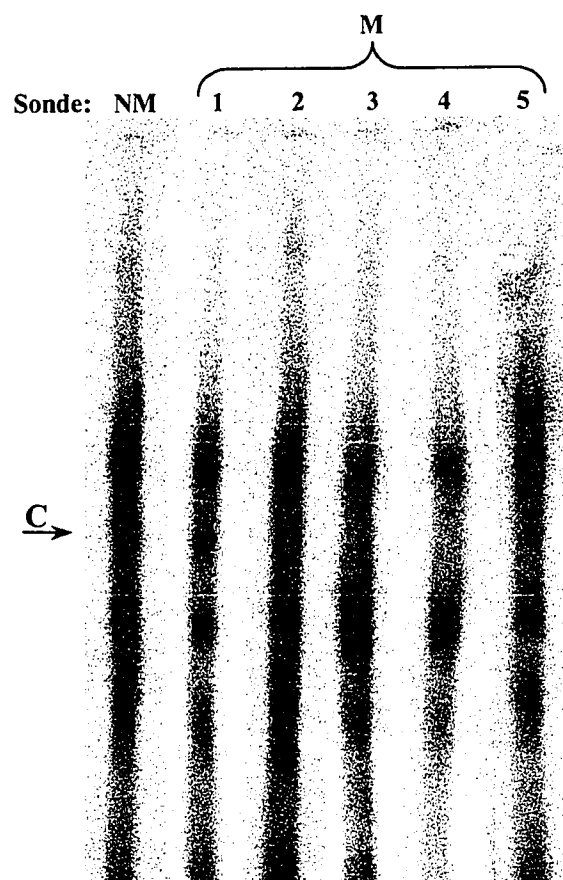
Suite aux résultats obtenus grâce aux études de compétition avec le poly(U), et pour confirmer la possibilité que certains résidus uridines situés dans la séquence conservée de 20 nts soient plus directement impliqués dans l'interaction spécifique des piARNm constituant le complexe C, nous avons élaboré des séquences de sondes mutées. Un total de cinq sondes mutées a été testé dans les ARN-EMSA; les séquences de ces mutants sont indiquées à la figure 3.12A. La capacité de chaque sonde à former le complexe C est indiquée à droite de sa séquence par les symboles + ou -. Basé sur les résultats d'ARN-EMSA présentés à la figure 3.12B, nous avons observé que certaines sondes mutées étaient positives (M1:+ et M2:++) pour la formation du complexe C, alors que d'autres étaient négatives (M3:- et M4:-). Tout d'abord, lorsque la moitié des nucléotides de la séquence 20-nt était mutée (1 nt sur 2), les complexes B et C étaient moins intenses, toute proportion conservée. La substitution arbitraire de seulement deux nucléotides n'a presque pas eu d'effet sur la formation du complexe C (M2: ++). Par la suite, nous avons examiné précisément la possibilité que le motif de quatre résidus U consécutifs, retrouvés dans la séquence 20-nt, soit important dans l'interaction spécifique. Des mutations au niveau de ce tétranucléotide ont donc été introduites en changeant la séquence UUUU pour CUGA (M3), UUGA (M4) ou CUUA (M5). Tel que présenté sur la figure 3.12B, les tétranucléotides mutés, CUGA (M3: -) et UUGA (M4: -), abolissaient la formation du complexe C, tandis que la séquence mutée CUUA (M5: +/-) montrait une faible interaction avec les protéines cytoplasmiques de MEG-01. Ces résultats ont indiqués que le motif UUUU était important dans la formation de l'interaction spécifique avec les piARNm dont la fixation à la séquence 20-nt était sensible à la durée de la stimulation au TPA. Étant donné que la séquence conservée est

Figure 3.12: Des mutations dans la séquence 20-nt affectent la formation du complexe spécifique. **A)** Séquences de la sonde sens non-mutée (NM) et des 5 sondes mutées (M) utilisées pour les ARN-EMSA. Les nucléotides mutés dans la séquence conservée de 20 nts (caractères gras) et plus particulièrement dans le tétranucléotide UUUU (séquences encadrées) sont en rouge. Basé sur les résultats des ARN-EMSA, la capacité, pour chaque sonde mutée, de former le complexe C est indiquée à droite de chaque sonde par les symboles + et -. **B)** ARN-EMSA représentatif de trois expériences indépendantes utilisant soit la sonde sens non-mutée radioactive ou l'une des cinq sondes mutées marquée au P^{32} , incubée avec un extrait cytoplasmique (20 μ g) de MEG-01 non-stimulées, en présence d'héparine (2.5 μ g/ μ l). Alors que la formation du complexe spécifique, indiqué par la flèche, était possible avec la sonde non-mutée et les sondes mutées M1 et M2, et jusqu'à un certain point avec la sonde M5, le complexe spécifique était complètement absent lorsque les sondes mutées M3 et M4 étaient utilisées dans les ARN-EMSA. Ces résultats semblaient indiquer que le motif UUUU était impliquée dans la formation spécifique du complexe C.

A)

						Formation du complexe C	
NM:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UUCA	UUUU	CCUGUU CAGUGAA 3'	++
M1:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UACG	UCUA	CUUAUC CUGAGUA 3'	+
M2:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UUCG	UCUU	CCUGUU CAGUGAA 3'	++
M3:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UUCA	CUGA	CCUGUU CAGUGAA 3'	-
M4:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UUCA	UUGA	CCUGUU CAGUGAA 3'	-
M5:	5'	GGGCGAAUUC	CUCGAG	UUCA	CUUA	CCUGUU CAGUGAA 3'	+/-

B)

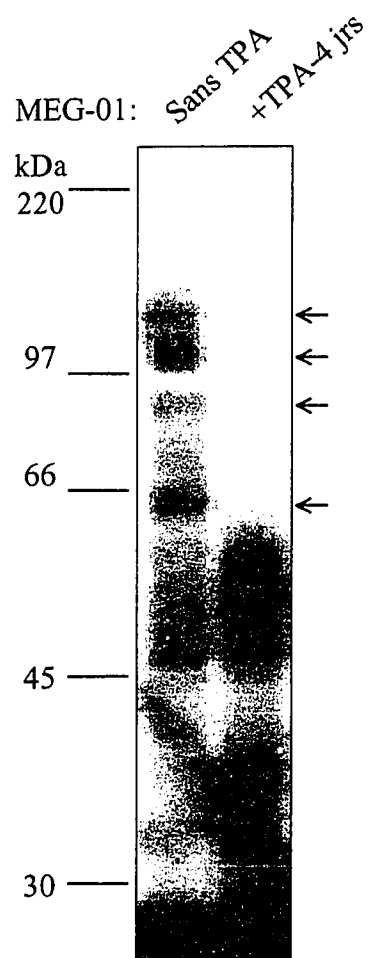


composée d'un total de 10 résidus U, cette observation n'élimine pas la possibilité que les autres U, en particulier les deux dimères UU situés de chaque côté du tétranucléotide, soient aussi impliqués dans l'interaction spécifique que représente le complexe C.

3.8 Caractérisation des protéines cytoplasmiques fixées à la séquence conservée de *PGHS-1*

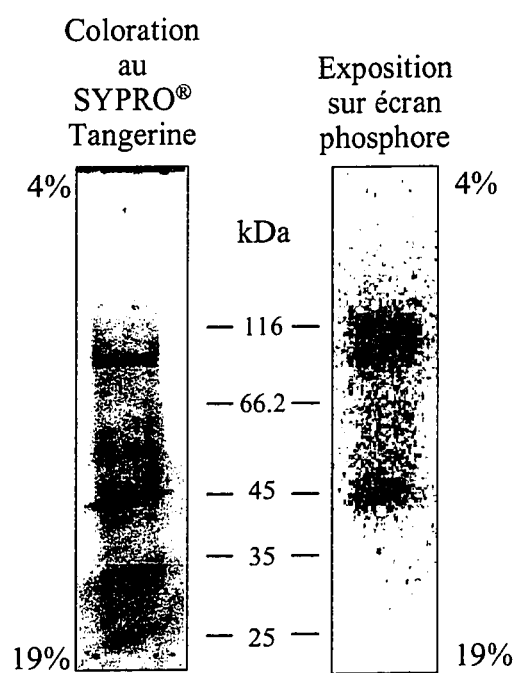
Dans le but d'estimer le poids moléculaire apparent des piARNm-PGHS-1 fixées à la sonde sens de 37 nts, nous avons pris avantage des irradiations UV qui interrelient de manière covalente la sonde d'ARN aux protéines qui y sont fixées directement. Nous avons, en premier lieu, soumis les réactions d'ARN-EMSA à une résolution sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Tel que présenté sur la figure 3.13, nous avons comparé une réaction d'ARN-EMSA dont l'extrait provenait de cellules non-stimulées (complexe spécifique présent) à une réaction faite en présence d'un extrait de MEG-01 stimulées pour 4 jrs au TPA (complexe spécifique absent). Conformément aux résultats de ARN-EMSA obtenus avec les gels natifs (Fig 3.7), les protéines fixées à la sonde d'ARN dans l'extrait non-stimulé étaient plus abondantes et généralement de poids moléculaire plus élevé que celles observées avec l'extrait +TPA-4jrs. En effet, autour de 66 kDa et plus, au moins quatre bandes détectées dans l'extrait non-stimulé étaient absentes dans l'extrait stimulé (indiquées par les flèches). Seul l'extrait +TPA-4jrs offrait un signal autour de 35 kDa qui rappelait le complexe -celui du bas- indiqué par les accolades et présent dans les extraits traités au TPA seulement (Fig. 3.7B). Cette analyse des réactions d'ARN-EMSA sur gels dénaturants n'a permis qu'à donner une indication de la taille possible des protéines faisant partie du complexe C.

Figure 3.13: Résolution des réactions d'ARN-EMSA sur gels d'électrophorèse dénaturants. Les interactions ARN-protéines ont été analysées sur gels de polyacrylamide 8.5% dénaturants et visualisées par autoradiographie afin d'estimer le poids moléculaire des protéines fixant la sonde d'ARN sens. Les protéines fixées à la sonde sens et provenant des MEG-01 non-stimulées sont distinctes de celles provenant des cellules stimulées: au moins quatre bandes (indiquées par les flèches) sont observées dans la zone de 66 kDa et plus; ces bandes sont absentes lorsque l'extrait stimulé au TPA pour 4 jrs est utilisé. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.



Pour analyser plus précisément la composition protéique du complexe C et déterminer le poids moléculaire des protéines qui le composent, il nous a fallu tout d'abord éliminer les complexes non-spécifiques (A, B et complexes des accolades) des réactions d'ARN-EMSA. Pour ce faire, nous avons réalisé plusieurs réactions d'ARN-EMSA en présence d'extraits non-stimulés et de sonde sens, que nous avons séparées sur des gels natifs 5%, comme auparavant. Une fois le complexe C résolu sur gel natif, nous avons isolé plusieurs copies de ce complexe et extrait, par élution, les protéines des bandes de gel correspondant au complexe C. Après avoir concentré le volume de protéines obtenu, leur nombre ainsi que leur poids moléculaire ont été déterminés par migration sur un gradient de polyacrylamide 4-19% en présence de SDS (Fig. 3.14). Les protéines du complexe C ont d'abord été visualisées par une coloration au SYPRO® Tangerine (Fig. 3.14, à gauche). Ceci a permis de constater que le complexe C était composé de plusieurs protéines, variant en taille de ~20 à ~116 kDa, dont certaines plus abondantes que d'autres, telles que les deux bandes migrant à environ 45 et 100 kDa. Afin d'établir laquelle de ces protéines était effectivement fixée directement à la sonde sens et permettait aux autres membres du complexe protéique de s'assembler au niveau de l'élément conservé, les gels ont été séchés puis exposés sur un écran phosphore (Fig. 3.14, à droite). En théorie, une seule bande radioactive est normalement détectée, puisque l'irradiation aux rayons UV permet d'établir une interaction covalente entre la sonde d'ARN et la ou les protéines interagissant avec cette dernière. Ainsi, suite à la migration sur gels dénaturants, il est possible de déterminer la taille de la protéine ou du complexe protéique interagissant directement avec la sonde d'ARN. Toutefois, dans notre cas, suite à l'exposition aux rayons UV, trois bandes radioactives ont été détectées

Figure 3.14: Caractérisation des protéines cytoplasmiques de MEG-01 fixant directement la séquence conservée de *PGHS-1*. La composition protéique du complexe spécifique, formé de la sonde sens et de protéines cytoplasmiques extraites de MEG-01 non-stimulées, a été analysée sur des gels de gradient de polyacrylamide 4-19% en présence de SDS. Le gel fut d'abord coloré au SYPRO® Tangerine afin de visualiser toutes les protéines du complexe C (à gauche), puis exposé sur un écran phosphore afin de déterminer la taille du complexe protéique fixé directement à la sonde d'ARN marquée (à droite). Le complexe spécifique est composé de protéines de poids moléculaire variant entre ~20 et ~116 kDa, dont deux protéines majeures autour de 45 kDa et de 100 kDa. L'analyse des signaux radioactifs observés autour de 45, 100 et 116 kDa suggère qu'il s'agit soit de la taille de 3 protéines fixées directement à la sonde d'ARN marquée ou soit de formes variées d'un complexe protéique de 116 kDa, composé d'un dimère de 45 kDa et d'une troisième protéine de faible poids moléculaire (~10-20 kDa).



sur gels dénaturants: deux bandes à 100 et à 116 kDa migrant comme un doublet, et une bande unique autour de 45 kDa. Cette multiplicité des bandes radioactives peut s'expliquer entre autre par l'inefficacité des rayons UV à interrelier la totalité des protéines interagissant avec la sonde. Étant donné la taille de la sonde (37 nts), il est raisonnable de considérer que les bandes à ~45 et ~100 kDa pourraient représenter, respectivement, la forme monomérique et dimérique d'une protéine de ~45 kDa fixée à l'ARN, alors que la bande à ~116 kDa correspondrait à la taille totale du complexe protéique mettant en jeu un troisième facteur de faible poids moléculaire (~10-20 kDa). Une seconde interprétation de cette multiplicité est qu'au cours des manipulations, la dégradation incontrôlée de la sonde d'ARN après l'exposition aux rayons UV, ait permis d'identifier trois protéines individuelles de taille différente, soit ~45, ~100 et ~116 kDa, toutes interagissant directement avec la sonde d'ARN et par conséquent, avec la séquence conservée de PGHS-1.

3.9 L'ARNm de PGHS-1 est associé avec les ribosomes après 1 jr de TPA

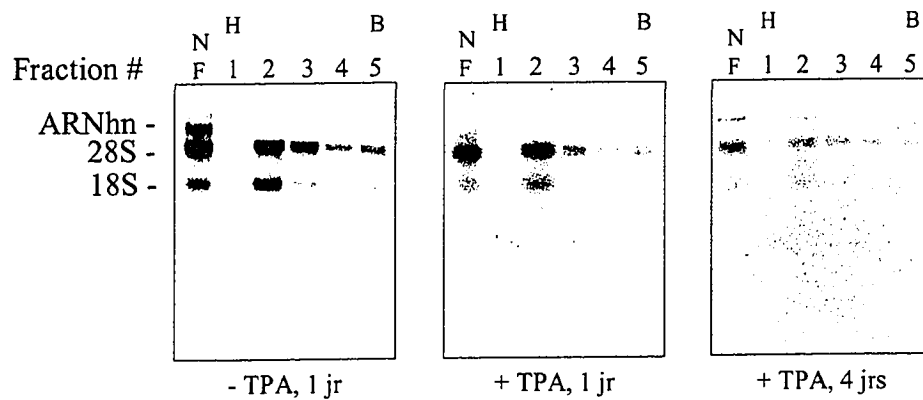
L'identification de protéines fixant de façon spécifique la séquence 20-nt dans les cellules non-stimulées et stimulées pour 1 jr, mais non dans les cellules stimulées pour 4 jrs, est inversement corrélée avec la détection de la protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01. Afin d'explorer le rôle possible qu'une telle interaction pourrait avoir dans le délai de l'accumulation de la protéine PGHS-1, nous avons examiné l'efficacité traductionnelle de l'ARNm *PGHS-1*, dans les cellules MEG-01 non-stimulées ainsi que dans les MEG-01 stimulées pour 1 et 4 jrs. Pour ce faire, nous avons fractionné l'ARN total en deux compartiments: l'ARNm sans ribosome et l'ARNm associé aux ribosomes.

Ainsi, dans le but de déterminer si les faibles niveaux protéiques de PGHS-1 après 1 jr de stimulation au TPA pouvaient être causés, du moins en partie, par la présence dans le cytoplasme, d'ARNm *PGHS-1* inactif, entreposés sous la forme de particules RNPM, inaccessibles à l'appareil traductionnel, nous avons analysé l'attachement de l'ARNm *PGHS-1* aux polysomes. L'ARN total de chacune des trois cultures cellulaires (-TPA, +TPA-1jr et +TPA-4jrs) fut appliqué sur une solution de sucrose 30% et centrifugé, tel que décrit dans le protocole de Garcia-Sanz, J.A (144). Les gels d'agarose/formaldéhyde de la figure 3.15A, montrent, pour chaque condition de TPA, la présence des ARNr de 18S et 28S dans l'ARN total extrait des MEG-01, d'une part avant fractionnement (non-fractionné; NF), ainsi que dans chacune des fractions obtenue après centrifugation sur sucrose. L'efficacité du fractionnement par le sucrose est démontrée par l'absence complète des ARNr de 18S et 28S dans la fraction #1, la fraction sans ribosome. Comme prévu, ces ARNr sont retrouvés dans les fractions #2 à #5, fractions où les ARNm sont liés aux ribosomes. Dans l'ensemble, nous avons observé une réduction dans les ARNr au fur et à mesure que la durée d'incubation avec le TPA augmentait, reflétant l'arrêt de croissance de ces cellules (136). Ceci est consistant avec une étude ayant rapporté une diminution de la quantité relative de polysomes dans les cellules HL-60 induites à se différencier par le TPA (135).

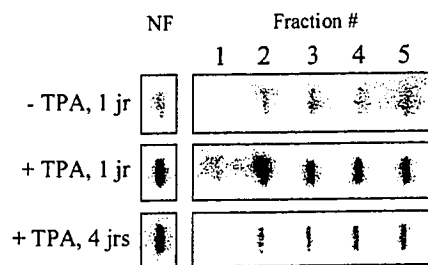
Pour chaque fraction récoltée après centrifugation, l'ARN fut extrait et précipité, puis appliqué dans les fentes d'un module permettant le transfert par succion de l'ARN sur des membranes de nylon. Celles-ci ont été hybridées avec la sonde radioactive de *PGHS-1* décrite précédemment. Afin de s'assurer de l'efficacité du traitement au TPA, l'ARNm *PGHS-1* a été détecté avant fractionnement (Fig. 3.15B, colonne de gauche);

Figure 3.15: Attachement des polysomes à l'ARNm *PGHS-1*. Les ARN totaux isolés soit des cellules MEG-01 non-stimulées (-TPA), stimulées 1 jr (+TPA-1jr) ou stimulées 4 jrs (+TPA-4jrs) ont été appliqués sur une solution de sucrose 30% pour permettre la séparation entre les RNPM libres et les ARNm liés aux polysomes. **A)** L'intégrité de l'ARN, telle que visualisée par la présence des ARNr de 18S et 28S, ainsi que la qualité du fractionnement ont été démontrés par l'électrophorèse des différentes fractions sur gels d'agarose 1% dénaturants, colorés au bromure d'éthidium (NF: ARN total non-fractionné; B: bas du tube; H: haut du tube). **B)** Détection de l'ARNm *PGHS-1* fractionné, transféré par fente sur une membrane de nylon et hybridé avec l'ADNc de *PGHS-1* utilisé comme sonde radioactive. La première fente à gauche représente un aliquot de l'ARN total isolé par la méthode du *Trizol*, soumis au même protocole de détection, mais non-fractionné. **C)** Représentation graphique de l'attachement ribosomal de l'ARNm de *PGHS-1* dans les cellules MEG-01 non-stimulées (X) versus stimulées pour 1 jr (□) ou 4 jrs (■). Pour chacune des cinq fractions, le résultat est un pourcentage du total d'ARNm *PGHS-1* présent dans le tube. Les membranes ont été exposées sur un écran phosphore, puis le signal de chaque fente quantifié par le programme "ImageQuant 5.1". Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et montrent que l'ARNm de *PGHS-1* est retrouvé dans les fractions d'ARNm liés aux ribosomes, que les cellules aient été stimulées pour 1 ou 4 jrs; l'ARNm *PGHS-1* n'est jamais présent dans la fraction représentant les RNPM.

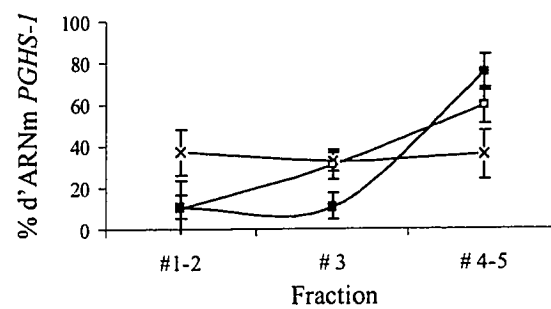
A)



B)



C)



tandis que dans les cellules non-stimulées, les niveaux d'ARNm de PGHS-1 sont faibles, les niveaux, dans les cellules stimulées pour 1 et 4 jrs, sont augmentés de façon similaire, comme montré sur la figure 3.1A. En ce qui concerne la distribution de l'ARNm *PGHS-1* après fractionnement, nous avons pu constater que dans toutes les conditions de traitement, l'ARNm *PGHS-1* était absent de la fraction #1 (Fig. 3.15B). Cette observation suggérait que cet ARNm n'était donc pas présent dans le cytoplasme des cellules +TPA-1jr sous forme libre de RNPm, mais plutôt préférentiellement attaché aux ribosomes, même si la protéine PGHS-1 n'y était pas détectée. Le graphique de la figure 3.15C illustre la distribution de l'ARNm *PGHS-1*, et est une représentation du fractionnement de l'ARNm *PGHS-1* dans chaque extrait de MEG-01, où les niveaux d'ARNm *PGHS-1* par fraction sont exprimés comme un pourcentage de la somme de l'ARNm *PGHS-1* des cinq fractions dans un même tube; les fractions #1-2 et #4-5 ont été combinées dans la représentation graphique. Cette mesure permet de compenser pour les variations dans les quantités totales d'ARN par tube, selon les conditions de traitement. Malgré que l'ARNm de PGHS-1 soit concentré dans les fractions associées aux ribosomes, aussi bien après 1 jr qu'après 4 jrs de stimulation, nous avons noté une différence dans la distribution fractionnaire de l'ARNm. En effet, dans les cellules +TPA-1jr, la quantité d'ARNm *PGHS-1* augmentait constamment entre les fractions #1-2, #3 et #4-5, tandis qu'après 4 jrs de stimulation, les niveaux d'ARNm *PGHS-1* étaient surtout augmentés dans les fractions #4-5. Tel que montré sur le graphique, cette distribution de l'ARNm de PGHS-1 à 1 et à 4 jrs de TPA résulte en un niveau d'ARNm légèrement plus élevé dans les fractions #4-5 dans les cellules +TPA-4jrs que dans les cellules +TPA-1jr. Trois autres fractionnements ont présenté un enrichissement

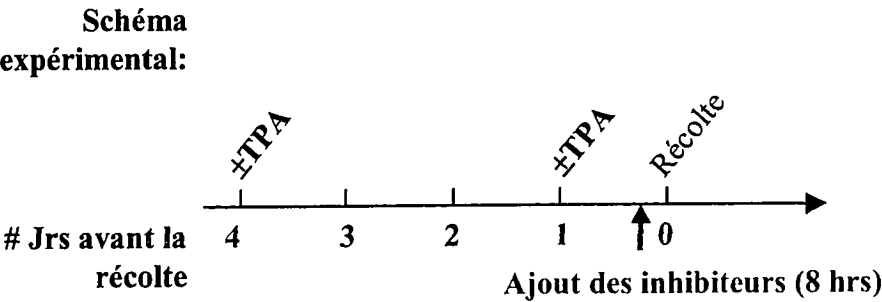
similaire (1.27 ± 0.06) d'ARNm *PGHS-1* associés aux polysomes dans la fraction #4-5, après 4 jrs de stimulation au TPA. La raison pour cela demeure inconnue, mais une augmentation de la taille des polysomes constitue une possibilité.

3.10 La protéine PGHS-1 n'est pas dégradée par les systèmes de protéolyse intracellulaire après 1 jr de TPA

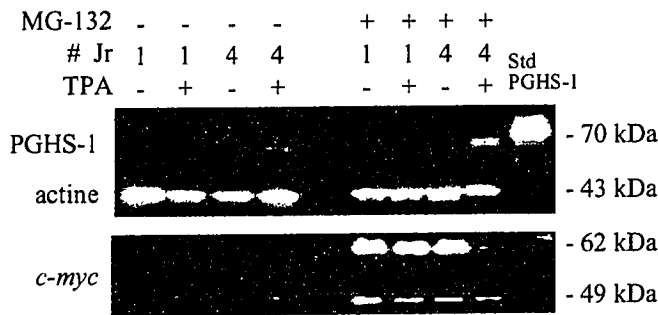
Étant donné que les résultats précédents suggéraient un attachement de l'ARNm *PGHS-1* aux ribosomes dans les MEG-01 +TPA-1jr, ce qui est une indication de l'activité traductionnelle, nous avons voulu déterminer si l'absence de protéine PGHS-1 dans ces cellules n'était pas une conséquence de la dégradation de la protéine PGHS-1 nouvellement synthétisée. Pour y parvenir, les MEG-01 stimulées ou non avec le TPA pendant 1 et 4 jrs ont été incubées pour une durée de 8 hrs précédant la récolte, avec l'un des inhibiteurs de protéolyse intracellulaire suivants, soit 100 μ M de MG-132, 20 μ M de PD150606 ou 100 μ M de chloroquine. Le MG-132 est un inhibiteur du système des protéasomes, alors que le PD150606 et la chloroquine inhibent respectivement, la dégradation par les calpaïnes et par les cathepsines (dégradation lysosomale). La figure 3.16 montre les niveaux de protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01 traitées ou non avec chacun des inhibiteurs, ainsi que les niveaux d'actine, utilisés comme contrôle interne. Comme prévu, en absence d'inhibiteur, la protéine n'est détectée que dans les MEG-01 +TPA-4jrs, et ceci n'a pas été changé par l'ajout d'inhibiteur de la dégradation. En effet, peu importe l'inhibiteur utilisé, les niveaux de protéine PGHS-1 n'ont pas été augmentés significativement dans les MEG-01 +TPA-1jr. Cependant, l'inhibition des protéasomes par le MG-132 (Fig. 3.16A) occasionnait une légère augmentation des

Figure 3.16: Effets de l'inhibition des systèmes protéolytiques sur les niveaux de protéine PGHS-1. A) Schéma expérimental: les MEG-01 ont été stimulées ou non avec le TPA pour 1 et 4 jrs, et traitées avec l'un des inhibiteurs de protéolyse, pour une période de 8 hrs précédant la récolte des cellules. Les inhibiteurs utilisés sont **B)** le MG-132 (100 μ M) et **C)** le PD150606 (à gauche) et la chloroquine (à droite). Les lysats cellulaires (10 μ g) ont été séparés sur gels de polyacrylamide (10%) dénaturants et les protéines PGHS-1 et actine (contrôle interne) ont été détectées simultanément par immunobuvardage Western. En B, pour contrôler positivement le traitement au MG-132, les membranes ont été incubées, dans un deuxième temps, avec l'anticorps anti-*c-myc*. Des extraits de MEG-01 n'ayant subi aucun traitement d'inhibition ont été analysés en parallèle. Std PGHS-1: 1 μ g. En absence d'inhibition, la protéine PGHS-1 (70 kDa) est détectée dans les MEG-01 stimulées pour 4 jrs, mais absente dans les MEG-01 stimulées pour 1 jr. Les niveaux de PGHS-1 détectés dans les MEG-01 stimulées pour 1 jr n'ont pas été augmentés en présence d'aucun inhibiteur. Les membranes présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes.

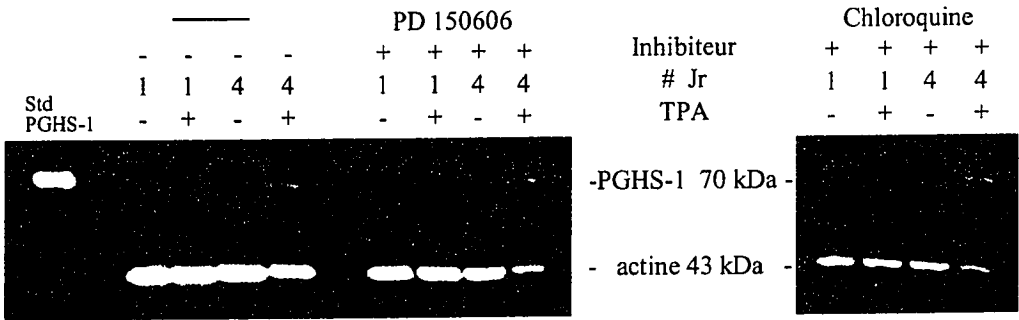
A)



B)



C)



niveaux de protéine PGHS-1 dans les MEG-01 +TPA-4jrs, qui pouvait être attribuable, par exemple, à l'inhibition de la dégradation d'une protéine influençant positivement la traduction de PGHS-1.

Par ailleurs, la protéine *c-myc*, reconnue pour être spécifiquement dégradée par les protéasomes, et non par les lysosomes ou les calpains (147), a servi de contrôle positif pour le traitement au MG-132, un inhibiteur spécifique de ce système. L'anticorps anti-*c-myc* reconnaît la forme protéique prédite de 49 kDa ainsi qu'une forme aberrante migrant à 62 kDa (Sigma, feuillet d'information). Comme prévu, la protéine *c-myc* fut détectée dans les cellules ayant été traitées avec le MG-132. Nous avons aussi noté une réduction de l'accumulation de *c-myc* dans les cellules stimulées pour 4 jrs. Une telle réduction a aussi été observée dans les cellules mégacaryoblastiques CHRF-288 stimulées au TPA (148) et a été attribuée à une diminution chronique des niveaux d'ARNm *c-myc* durant la différenciation par le TPA. Par ailleurs, la redondance des trois systèmes de dégradation et la moins grande sélectivité de la dégradation par les lysosomes et les calpains, font que nous n'avons pu contrôler positivement les traitements à la chloroquine et au PD150606. En résumé, ces observations nous ont suggéré que la protéine PGHS-1 n'était pas dégradée par les voies de protéolyse intracellulaires au premier jour de stimulation au TPA, et donc qu'une faible traduction de l'ARNm *PGHS-1*, plutôt que la dégradation protéique, serait probablement responsable du manque de protéine PGHS-1 dans les cellules MEG-01 moins différenciées.

4. DISCUSSION

4.1 Profil d'expression du gène *PGHS-1* et régulation post-transcriptionnelle

Malgré le rôle clé que joue l'enzyme PGHS-1 dans la production du TxA_2 par les plaquettes et malgré qu'elle soit la cible de l'Aspirin utilisée dans la prévention et la thérapie des maladies cardiovasculaires associées à une hyperfonction des plaquettes (2;6), la régulation de l'expression du gène *PGHS-1* est peu comprise. Le haut contenu des plaquettes en PGHS-1 est le résultat de l'expression du gène dans les cellules précurseurs, par conséquent nous avons développé un modèle *in vitro* utilisant la lignée cellulaire précurseur MEG-01 qui lorsque stimulée avec une quantité optimale de TPA, soit 16 nM (12), est considérée comme un outil intéressant pour comprendre l'expression du gène *PGHS-1* dans les plaquettes. À l'aide de ce modèle de différenciation *in vitro*, nous avons démontré que la présence de la protéine PGHS-1, dont les niveaux ne sont pas assez élevés pour être détectés par immunobuvardage Western dans les MEG-01 peu différenciées, était induite après l'addition de TPA d'une manière sensible à la concentration et à la durée de l'exposition (149). Cependant, cette induction de la protéine était tardive (3-4 jrs), et précédée par l'augmentation rapide (dès 6 hrs) de l'ARNm *PGHS-1* qui atteint un niveau maximal dans les 24 hrs suivant la stimulation au TPA (Fig. 1.8).

Cette induction des niveaux d'ARNm *PGHS-1* n'est pas limitée à notre modèle *in vitro*. Ainsi, l'expression du gène *PGHS-1* semble être modulée au cours du développement, tel qu'observé durant le développement pulmonaire chez l'agneau (73) et durant la période de puberté de l'agneau où l'augmentation des niveaux d'androgènes des vésicules séminales fait augmenter l'expression de *PGHS-1* (150). Allant dans la même

direction, d'autres études faites sur des cerveaux de rats (151), de porcs (152) et d'agneaux (153), arrivés à différents stades de développement, ont aussi montré que l'expression de l'ARNm de PGHS-1 augmentait avec l'avancée du développement, pour atteindre les niveaux les plus hauts chez l'animal adulte. Par ailleurs, des expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires pouvant mimer la différenciation cellulaire ont démontré que l'expression de PGHS-1 augmentait aussi durant le processus de différenciation. Ainsi, la synthèse de PGHS-1 est stimulée lors de la maturation, induite *in vitro*, des mastocytes dérivées de la moelle osseuse (154) ou encore dans les cellules monocytiques THP-1 induites, par le TPA, à se différencier en macrophages (76). Dans chacune de ces études, comme dans la nôtre, l'expression de *PGHS-1* est maintenue et semble devenir une caractéristique permanente de la cellule différenciée.

Toutefois, notre modèle se distingue des exemples ci-haut par le délai que nous avons observé dans la détection de la protéine PGHS-1, 2 jours après que l'ARNm ait atteint son niveau maximal, et il faut compter 3 à 5 jrs de plus pour l'atteinte du niveau maximal de protéine (Fig. 1.8). En accord avec nos observations, un groupe a récemment rapporté une régulation du gène *PGHS-1* dénotant également un délai, dans deux lignées cellulaires de neuroblastomes (77). En effet, lors de la différenciation des cellules NG 108 et N2a par l'addition d'acide rétinoïque, l'ARNm et la protéine PGHS-1 augmentent respectivement, après 24 et 48 hrs de stimulation. Les auteurs ont montré que l'augmentation de l'ARNm était détectable après 6 hrs et était maintenue après 24 et 48 hrs, cependant la protéine PGHS-1 n'était détectée de façon consistante qu'après 48 hrs de stimulation. Dans notre modèle, l'observation d'un délai d'au moins 2 jrs entre l'accumulation d'ARNm et l'augmentation des niveaux de protéine PGHS-1 soulève la

possibilité d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *PGHS-1*. En effet, il est vraisemblable que la production d'une protéine dans une cellule ne soit pas toujours corrélée avec son contenu en ARNm, principalement à cause des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et des modifications post-traductionnelles qui peuvent affecter la qualité et la quantité de protéine qu'un gène va produire (155). D'ailleurs, un contrôle post-transcriptionnel est généralement plus rapide qu'un contrôle transcriptionnel impliquant la maturation de l'ARN et causant un délai de 15 min ou plus dans la réponse au stimulus (101). De plus, le contrôle post-transcriptionnel est avantageux, car il permet l'expression coordonnée de plusieurs gènes impliqués dans une même voie biochimique ou une même structure (155). Ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle englobent le contrôle de la stabilité et de la localisation de l'ARNm, ainsi que l'efficacité de traduction de cet ARNm.

Néanmoins, pour la vaste majorité des gènes, la transcription menant à la synthèse de l'ARNm est l'étape limitante de leur expression (156). En effet, la synthèse d'une protéine spécifique est limitée par la concentration cytoplasmique de son ARNm qui, elle-même, dépend du taux de transcription de l'ARNm et de la stabilité de celui-ci (101). Dans notre modèle, l'accumulation d'ARNm *PGHS-1* est considérable après quelques heures de stimulation au TPA (12). Toutefois, les éléments du promoteur de *PGHS-1* médiant la réponse transcriptionnelle au TPA n'ont pas encore été identifiés; des mutations dans les deux éléments Sp1 identifiés précédemment n'ont pas altéré significativement l'augmentation minime (~2x) de l'activité du promoteur de *PGHS-1* en réponse au TPA (65;68). De plus, dans notre modèle, les forts niveaux d'ARNm *PGHS-1* sont maintenus durant une période de 8 jrs, ce qui suggère la présence d'un ARNm

stable; le transcrit de 2.8 kb de PGHS-1, le plus abondant, ne contient qu'un seul motif d'instabilité AUUUA dans sa R3'NT (69). Nous avons montré que dans les MEG-01 traitées au TPA (2 jrs), tout comme dans celles non-traitées, la demi-vie des transcrits de PGHS-1 était évaluée à au moins 8 hrs; elle n'a pas été vérifiée au-delà de cette période étant donné la toxicité des drogues utilisées comme inhibiteurs de la transcription (149). En accord avec nos résultats, l'ARNm *PGHS-1* de fibroblastes non-stimulées n'a pas diminué après 10 hrs de traitement avec des inhibiteurs de la transcription (157). Ces observations suggèrent que l'ARNm de PGHS-1 est relativement stable et que la concentration cytoplasmique d'ARNm ne constitue pas un facteur limitant pour la synthèse de PGHS-1 dans les MEG-01 +TPA-1jr. Comme, quantitativement, les niveaux d'ARNm étaient similaires dans les deux extraits stimulés au TPA (+TPA-1jr et +TPA-4jrs; Fig. 3.1), nous avons émis l'hypothèse qu'un changement dans le statut de l'ARNm *PGHS-1* pourrait expliquer la différence observée dans les niveaux protéiques de PGHS-1 de ces deux extraits.

4.2 Interaction spécifique ARN-protéines dans la R3'NT de l'ARNm *PGHS-1*

Cette distinction dans le statut de l'ARNm *PGHS-1* dans les MEG-01 +TPA-1jr versus +TPA-4jrs nous est venue de l'observation d'une interaction spécifique ARN-protéines au niveau d'un élément conservé de la R3'NT de *PGHS-1*. La formation du complexe spécifique était conditionnelle à la présence de protéines isolées de MEG-01 non-stimulées ou stimulées pour 1 jour seulement; absence d'interaction spécifique avec les extraits +TPA-4jrs.

-Séquence d'ARN: élément-*cis*

Il est bien connu que la régulation post-transcriptionnelle d'ARNm spécifique peut être médiée par des séquences régulatrices présentes dans la R5'NT, tout comme dans la R3'NT. Ces séquences sont probablement responsables de la régulation de la traduction via des interactions avec des facteurs agissant en *trans*. Les éléments-*cis* médiant une régulation post-transcriptionnelle sont souvent caractérisés par leur répétition et leur conservation à travers les espèces (78). La séquence R3'NT de *PGHS-1* permettant la formation du complexe spécifique C, telle que démontrée par l'utilisation de sondes antisens (Fig. 3.7-3.9) et de sonde homologue non-marquée dans des études de compétition (Fig. 3.10), est une courte séquence de 20 nts parfaitement conservée entre l'homme, la souris, le rat et le mouton (Fig 3.2). De plus, cette séquence 20-nt semble être unique à l'ARNm de *PGHS-1*; comme une recherche à l'aide du logiciel BLAST a révélé, elle n'est retrouvée dans aucun autre gène. En comparaison, certains ARNm possédaient tout au plus 16 des 20 nts de la séquence de *PGHS-1*, mais les 16 nts conservés n'étaient pas toujours les mêmes d'un ARNm à l'autre. Ces ARNm sont entre autre: *corneal epithelial rho-associated-ser/thr kinase* (*Oryctolagus cuniculus*), *alpha-(1,3)-fucosyltransferase Fuc-TVII* (*Mus musculus*), *aquaporin-1 homolog* (*Bufo marinus*), *cytochrome P-450* (*Rattus norvegicus*), *carcinoma associated HOJ-1* (*Homo sapiens*), *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1* (*Homo sapiens*).

Nous avons identifié dans la littérature d'autres éléments-*cis* agissant comme régulateurs post-transcriptionnels, n'ayant que 20 nts et présents dans la R3'NT des ARNm. Toutefois, ces éléments-*cis* de 20-nt ne partagent pas d'homologie avec la séquence conservée de *PGHS-1*. Dans ces exemples, la fixation de protéines à la

séquence de 20 nts semble déstabiliser l'ARNm. C'est le cas des ARNm de *c-fos* (158), du récepteur β_2 -adrénergique (159), de peptidylglycine α -amidating monooxygénase (PAM) (160) et de ribonucleotide reductase R2 (R2) (161). Dans l'exemple de *c-fos*, la séquence de 20 nts, riche en résidus U, est localisée dans la moitié 3' d'un élément ARE de 75 nts. Cette séquence ne contient pas de motif AUUUA mais serait le site de fixation de 4 URBP (*U-rich binding proteins*) impliquées dans l'enlèvement de la queue de poly(A) et par conséquent, dans la dégradation de cet ARNm (158). Quant à l'élément de 20 nts de l'ARNm du récepteur β_2 -adrénergique, il est riche en résidus A et U et a la particularité de contenir un hexamère AUUUUA rappelant le segment AUUUUC de l'élément conservée de PGHS-1, seul le dernier nucléotide diffère. Cet hexamère et les régions riches en résidus U l'entourant, sont nécessaires à la fixation de la protéine β ARB (35 kDa, *β -adrenergic receptor mRNA-binding protein*), identifiée comme étant la protéine HuR (162), qui médie la dégradation de cet ARNm (159). L'élément de 20 nts conservé de l'ARNm de PAM interagirait spécifiquement avec une protéine de 46 kDa, largement distribuée dans les tissus. Cette interaction aurait probablement aussi un rôle dans la stabilité de l'ARNm (160). Dans le cas de l'ARNm *R2*, présent dans les fibroblastes, un complexe protéique de 45 kDa est formé avec la séquence de 20 nt de l'ARNm *R2*, mais sa formation serait toutefois diminuée après l'ajout de TPA aux cellules. Cette diminution de l'activité spécifique à la séquence de 20 nts de *R2* était corrélée avec une diminution du taux de dégradation de l'ARNm (161). Dans notre modèle, malgré que l'interaction protéique soit négativement affectée par le TPA, il semble que les niveaux d'ARNm *PGHS-1* soient élevés même en présence de l'interaction spécifique à la séquence 20-nt (Fig. 3.1 et 3.7; +TPA-1jr) et qu'ils

demeurent ainsi après l'abolissement de l'interaction (Fig. 3.1 et 3.7; +TPA-4jrs). Toutefois, nous ne pouvons pas directement conclure que cette interaction n'a pas une fonction déstabilisante sur l'ARNm de *PGHS-1*.

De façon similaire aux éléments-*cis* des ARNm rapportés ci-haut, il n'y a qu'une copie de cet élément-*cis* de 20 nts dans l'ARNm *PGHS-1*. La séquence 20-nt de *PGHS-1* contient 10 résidus U, dont le motif UUUU qui a attiré notre attention. L'importance des résidus U dans l'interaction spécifique C que nous avons observée a été vérifiée par des expériences de compétition où un ribopolymère poly(U) a réussi à compétitionner cette interaction, alors que le poly(C) ou le poly(A) n'y sont pas parvenus (Fig. 3.11). Par ailleurs, malgré la formation du complexe B avec la sonde antisens, qui suggérerait sa non-spécificité de séquence, le fait que sa formation n'ait pas été compétitionnée par aucun des poly(N) utilisés, indique qu'il pourrait tout de même être de nature séquence spécifique. D'ailleurs, le complexe B, tout comme le complexe C, est dépendant de la durée d'exposition au TPA et est aussi inversement corrélé avec l'augmentation des niveaux de protéine *PGHS-1*. Par conséquent, il pourrait aussi participer à la régulation de l'expression de *PGHS-1*. Cependant, l'absence de formation du complexe spécifique C, et non du complexe B, lorsque des mutations au niveau du tétranucléotide UUUU étaient introduites dans la sonde sens de *PGHS-1* (Fig. 3.12), nous a indiqué que ces résidus U étaient importants pour médier la spécificité de l'interaction avec les protéines entrant dans la formation du complexe C et donc, qu'ils auraient une implication directe dans le rôle joué par une telle interaction dans l'expression du gène *PGHS-1*. Fait intéressant, un exemple de répression traductionnelle médiée par la fixation du facteur protéique Mpt5 au tétranucléotide UUGU de l'ARNm *HO* dans l'organisme *S. cerevisiae*

a été rapporté. Dans cet ARNm, lorsque le tétranucléotide UUGU, situé dans la R3'NT, est muté en UACU, la répression de la traduction, normalement médiée par la protéine Mpt5, est abolie suite à l'absence d'interaction ARN-protéine (163). Comme dans cet exemple, nous avons observé que l'absence de l'interaction spécifique C, dépendante du tétranucléotide UUUU, corrélait avec l'augmentation des niveaux de protéine PGHS-1. Il est donc raisonnable de supposer qu'une telle interaction au niveau de la R3'NT de l'ARNm *PGHS-1* pourrait médier la répression de la traduction de PGHS-1 dans les cellules +TPA-1jr.

-Protéines interagissant avec l'ARNm: éléments-*trans*

Dans les cellules eucaryotes, les ARNm sont presque toujours associés avec des protéines qui contrôlent chaque aspect de leur métabolisme: maturation, transport, localisation, stabilité et efficacité traductionnelle. Les protéines interagissent avec les transcrits primaires et les ARNm via des domaines de fixation pouvant mesurer entre 70 et 150 aa (164). La majorité des piARNm contiennent un ou plusieurs modules de fixation à l'ARNm et au moins un domaine auxiliaire (165). Il existe trois classes majeures de domaine de fixation à l'ARNm: 1. RRM (*RNA-recognition motif*); 2. dsRBD (*double stranded RNA binding domain*); 3. KH (*K-homology domain*) (164). Le domaine RRM (aussi appelé domaine RNP ou CS-RBD (*Consensus sequence-RNA binding domain*)) est le plus commun (146;165). Certaines protéines possèdent même plusieurs copies du domaine RRM. Celui-ci mesure 90 aa, contient deux séquences consensus, RNP1 et RNP2, séparées d'environ 30 aa, et est composé de 4 brins β formant un feuillet β antiparallèle entassé contre 2 hélices- α . La plupart des aa qui interagissent avec l'ARNm semblent être situés dans le feuillet β . Deuxièmement, le

domaine dsRBD, structurellement semblable au domaine RRM, est retrouvé entre autre dans la protéine Staufén, chez la drosophile (166). Il fixe les ARN double brin (db), mais ne peut pas fixer les ADNdb ou les hybrides ARN-ADN. De plus, ce domaine n'a pas de spécificité de séquence puisqu'il ne contacte pas directement les bases de l'ARN (164). D'ailleurs, à l'exception du domaine dsRBD, il semble que la fixation à l'ARNm cause des réarrangements dans la conformation de la protéine fixant l'ARNm (146;164). Le troisième domaine, le domaine KH, a été tout d'abord identifié dans la protéine humaine RNPhn K (167). Il est constitué de répétitions de 45 aa qui, chez la protéine RNPhn K, sont séparées par trois peptides RGG (peptide de 26 aa contenant 4 répétitions Arg-Gly-Gly) (165). Bien que ce domaine partage la structure $\alpha\beta$ des motifs RRM et dsRBD, les protéines ayant un domaine KH fixent l'ARN d'une façon différente des domaines RRM et dsRBD; les aa situés dans les boucles seraient impliqués dans les interactions avec l'ARN simple brin (164). Finalement, d'autres domaines, appelés domaines auxilliaires, en médiant les interactions protéine-protéine homo- ou hétérotypique ainsi qu'en localisant les piARNm dans la cellule, s'avèrent aussi essentiels pour la fonction des piARNm (165). De plus, même si la spécificité d'une protéine est largement déterminée par son domaine de fixation à l'ARN, certains domaines auxilliaires sont impliqués dans la fixation à l'ARN. Par contre, ces interactions sont généralement non-spécifiques et ne font qu'augmenter la reconnaissance spécifique par le domaine de fixation à l'ARN (168). D'ailleurs, une interaction directe faible entre piARNm et ARN n'implique pas nécessairement une faible spécificité: la spécificité d'une cible peut être médiée par plusieurs interactions protéine-protéine faibles, impliquant les domaines auxilliaires (146).

Nous avons démontré que le complexe spécifique était composé de protéines provenant du cytoplasme; le complexe C était également formé avec des extraits nucléaires, mais avec moins d'intensité (Fig. 3.4). Cette observation suggère que les protéines fixées à la séquence R3'NT de PGHS-1 pourraient faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, et être davantage concentrées dans ce dernier compartiment. C'est le cas de la piARNm AU-A (34 kDa) qui fixe une variété de séquences d'ARN riches en résidus U. Elle est normalement plus abondante dans le noyau et fait partie d'un complexe protéique qui participe au transport nucléocytoplasmique des ARNm nouvellement synthétisés. Toutefois, en absence de transcription, elle se concentrerait dans le cytoplasme où elle aurait un rôle dans le métabolisme cytoplasmique de l'ARNm (169). Nous avons aussi observé que le complexe spécifique C, formé en présence de l'élément-*cis* de PGHS-1, était composé d'une multitude de protéines (Fig. 3.14). En effet, les protéines ne sont pas nécessairement fixées directement à l'ARNm, mais peuvent tout de même participer à la formation et à la spécificité du complexe, à travers des interactions protéine-protéine avec les protéines déjà fixées à l'ARNm. Suivant l'interprétation des résultats de la figure 3.14 qui propose que le facteur *trans* pourrait être un complexe de ~116 kDa constitué de trois protéines, la faible détection de celui-ci par la coloration au tangerine suggère qu'il n'a pas été efficacement, c'est-à-dire dans sa totalité, interrelié à la sonde par l'irradiation aux rayons UV et n'a pas résisté à la résolution sur gels dénaturants; les principales composantes du complexe de 116 kDa étant principalement retrouvées sous forme monomérique (bande à ~45 kDa) ou dimérique (bande à ~100 kDa), tandis que la composante de ~10-20 kDa n'est pas visible sur le gel gradient 4-19%. La coloration au SYPRO® Tangerine a, en effet,

révélé la présence de deux protéines particulièrement abondantes qui se sont avérées correspondre à deux des bandes radioactives, celles autour de 45 et de 100 kDa. Comme suggéré précédemment, ces bandes pourraient correspondre aux formes monomérique et homodimérique d'une protéine de 45 kDa qui est capable d'interagir, seule ou dimérisée, directement avec l'ARN. D'autrepart, dans l'alternative que les trois bandes radioactives détectées correspondraient plutôt à trois protéines de ~45, ~100 et ~116 kDa individuellement en contact direct avec la sonde d'ARN, l'observation que la protéine correspondant à la bande radioactive autour de 116 kDa soit très peu abondante sur le gel coloré, mais ait un signal radioactif intense (Fig. 3.14), suggère qu'il pourrait s'agir d'une protéine très spécifique avec une activité de fixation très efficace.

Basé sur nos observations que le complexe spécifique n'était pas formé avec deux des sondes mutées (Fig. 3.12), et donc que certains des résidus U de la séquence 20-nt étaient requis pour l'interaction spécifique des protéines, nous prévoyons que les protéines reconnues pour fixer des régions nucléotidiques riches en résidus U, incluant les protéines (Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire) RNPhn, seraient des candidates potentielles (165). Le terme RNPhn regroupe l'ensemble des protéines associées aux ARNhn, qui ne font pas partie des autres classes de complexes ribonucléoprotéiques, tels que les snRNP (*small nuclear RNP*) (165). En effet, les transcrits nouvellement produits par l'ARN polymérase II, réunis sous le terme de ARNhn (ARN hétérogènes nucléaires), à cause de leur hétérogénéité de taille et de leur localisation cellulaire, sont immédiatement pris en charge par des protéines, telles que les RNPhn. Dans les cellules humaines, il existe au moins 20 types majeurs de protéines RNPhn de taille variant entre 34 et 120 kDa, et qui fixent l'ARN principalement via des domaines RRM (146;165).

Elles sont très abondantes dans le noyau et demeurent associées avec les pré-ARNm, sous forme de complexes RNPhn, jusqu'à ce que leur maturation soit complète, et ensuite avec les ARNm matures durant leur transport nucléocytoplasmique (146). En effet, bien que les protéines RNPhn soient souvent localisées dans le noyau, et y soient même restreintes (eg: C et U), certaines d'entre elles font la navette entre le noyau et le cytoplasme (eg: A et B). Les complexes RNPhn sont hétérogènes, labiles et composés d'un grand nombre de protéines différentes. D'ailleurs, la composition protéique des complexes RNPhn peut changer tout au long de la maturation des pré-ARN et du transport nucléocytoplasmique de l'ARNm, selon que les protéines aient un rôle à jouer dans le coiffage, l'épissage, la polyadénylation ou le transport de l'ARNm vers le cytoplasme (146;165).

Parmi les RNPhn connues, les RNPhn C1/C2 (41 et 43 kDa) qui ont une très forte avidité pour les séquences riches en résidus U pourraient être de bonnes candidates pour fixer la séquence de 20 nts de PGHS-1, cependant jusqu'à présent les études ont montré qu'elles étaient confinées au noyau où elles jouent un rôle durant l'épissage du transcrit primaire (165;170). C'est également le cas des protéines RNPhn U de 120 kDa et RNPhn G de 43 kDa (165;171), dont les poids moléculaires rappellent ceux des piARNm-PGHS-1 visualisées sur gels dénaturants (Fig. 3.14). D'autrepart, les protéines RNPhn D (44-48 kDa) et E (36-43 kDa) fixent la séquence UUAG de façon spécifique; la mutation de n'importe quels de ces nucléotides abolit l'interaction (172). Ce tétranucléotide est toutefois absent dans la séquence 20-nt de *PGHS-1*. Par ailleurs, les RNPhn des groupes A et B (35-40 kDa) ont été détectées dans le cytoplasme et semblent faire la navette entre celui-ci et le noyau. Ces observations impliquent que ces protéines

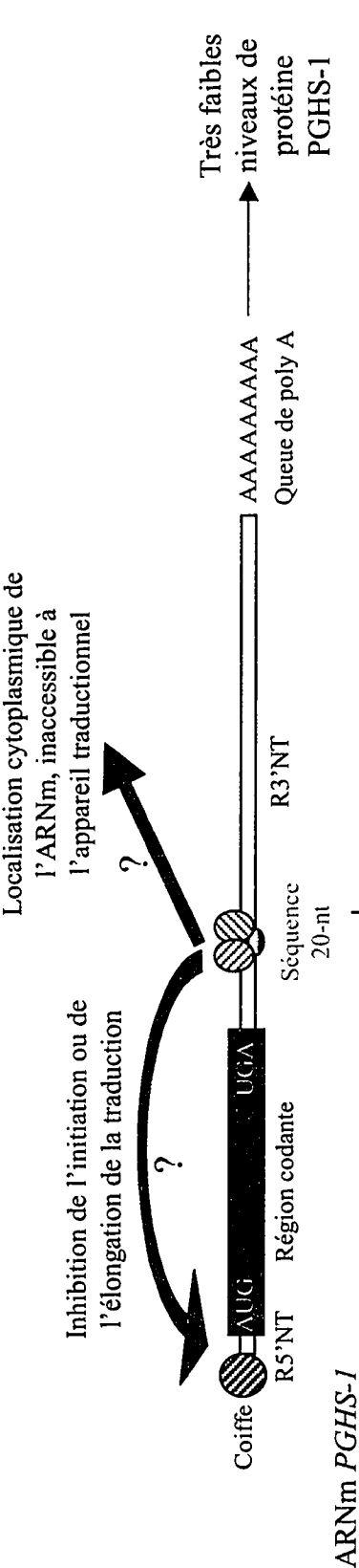
pourraient également avoir une fonction cytoplasmique dans le métabolisme des ARNm (165). Par exemple, dans le noyau, la protéine RNPhn A1 fixe des séquences de polypyrimidine limitées par les résidus AG en 3' des introns, et module l'épissage. Par contre, dans le cytoplasme, elle est associée avec les ARNm polyadénylés, préférentiellement via des séquences AUUUA répétées (ARE). Les deux formes de RNPhn A1, nucléaire et cytoplasmique, ont des profils de fixation à l'ARN différents (85). Cette dernière protéine ou des protéines fonctionnellement semblables seraient des protéines potentiellement aptes à interagir avec la séquence 20-nt de PGHS-1.

4.3 Rôles possibles d'une interaction spécifique ARN-protéines dans la régulation post-transcriptionnelle du gène *PGHS-1*

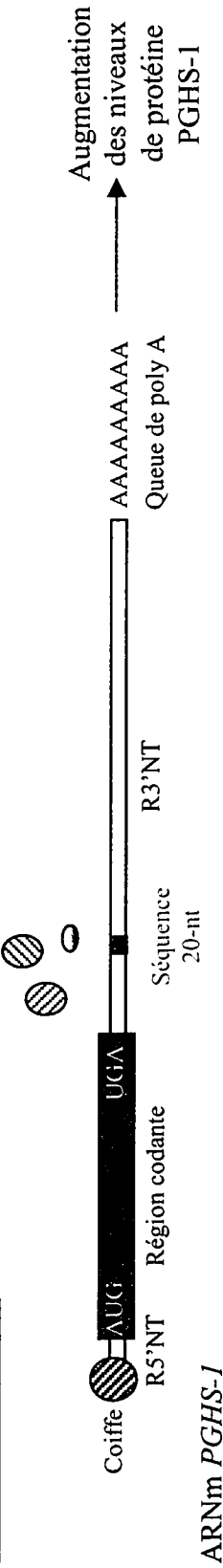
La conséquence physiologique de l'interaction protéique entre la séquence conservée de la R3'NT de PGHS-1 et les protéines cytoplasmiques n'est pas connue. Nous proposons un modèle (Fig. 4.1) dans lequel une interaction protéique à la séquence 20-nt de *PGHS-1* préviendrait la synthèse de l'enzyme PGHS-1. À l'opposé, lorsque les piARNm-PGHS-1 ne seraient pas fixées à la séquence 20-nt, la traduction aurait lieu menant à l'accumulation de l'enzyme PGHS-1. Le mécanisme par lequel l'interaction protéique empêche la traduction de l'ARNm *PGHS-1* n'est pas établi et l'identité des protéines identifiées comme interagissant avec l'ARNm de PGHS-1 reste également à être déterminé. Une fois que les protéines faisant partie du complexe C seront identifiées, leur rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *PGHS-1* pourra être davantage déterminé. Des expériences de traduction *in vitro* pourront être utilisées pour tester l'activité des protéines identifiées sur la traduction de

Figure 4.1: **Modèle de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *PGHS-1* dans les MEG-01 stimulées au TPA.** Dans les cellules MEG-01 stimulées au TPA pour 1 jr, la répression de la traduction de l'ARNm *PGHS-1* serait médiée par une interaction spécifique et directe entre un élément-*cis* conservé dans la R3'NT de *PGHS-1*, la séquence 20-nt, et trois protéines retrouvées dans le cytoplasme des cellules MEG-01. Le rôle de cette interaction spécifique dans la répression traductionnelle de l'ARNm *PGHS-1* n'a pas encore été déterminé; elle pourrait empêcher l'initiation ou l'élongation de la traduction ou influencer la localisation cytoplasmique de l'ARNm. Notre modèle propose qu'une fois l'interaction abolie dans les cellules MEG-01 stimulées pour 4 jrs au TPA, la traduction de la protéine PGHS-1 pourrait avoir lieu et permettre à la protéine de s'accumuler dans les MEG-01.

MEG-01 +TPA-1ir



MEG-01 +TPA-4irs



l'ARNm *PGHS-1*. De même, l'analyse du profil d'expression tissulaire de ces piARNm-*PGHS-1* et de leur régulation pourra nous éclairer sur l'abondance des niveaux de *PGHS-1* dans certains tissus.

Lorsque la traduction est contrôlée directement par une interaction spécifique ARN-protéine, la piARNm semble plutôt agir comme un régulateur négatif, un répresseur de la traduction, dont la fixation à une séquence spécifique de l'ARNm résulte en l'inhibition de la synthèse protéique. Généralement, l'initiation de la traduction est l'étape la plus limitante et contrôlée, souvent au niveau de la liaison de la sous-unité 40S à l'ARNm. En effet, l'initiation requière le recrutement d'une multitude de facteurs interagissant tantôt avec le ribosome ou l'ARNm, tantôt avec les aminoacyl-ARNt impliqués dans la synthèse protéique. Plusieurs facteurs préparent l'ARNm à sa liaison au complexe de pré-initiation 40S: eIF-4F reconnaît la coiffe en 5' via sa sous-unité eIF-4E; les facteurs eIF-4A et eIF-4B joignent ensuite le complexe et défont les structures secondaires de l'extrémité 5' grâce à leur activité hélicase dépendante de l'hydrolyse d'ATP. C'est par la suite que le complexe d'initiation 40S commence à balayer l'ARNm à la recherche du codon d'initiation AUG. Une fois le codon d'initiation identifié et le complexe d'initiation 40S positionné, la jonction avec la sous-unité ribosomale 60S, afin d'obtenir le complexe d'initiation 80S, se produit et la synthèse protéique commence (101).

Nos études d'ARN-EMSA ont suggéré que des facteurs protéiques de régulation, présents dans des MEG-01 non-stimulées ou stimulées pour 1 jr seulement, formaient un complexe spécifique avec la séquence conservée dans la R3'NT de *PGHS-1* (Fig. 3.7). Le rôle le plus probable d'une telle interaction protéique dans la R3'NT de *PGHS-1* est

de prévenir l'accumulation de la protéine PGHS-1. Dans un modèle similaire à la différenciation des mégacaryocytes, la différenciation des érythrocytes est associée avec la répression traductionnelle du gène *15-lipoxygénase (15-LOX)* (173). Des comparaisons intéressantes peuvent être faites entre les enzymes 15-LOX et PGHS-1, entre autre que les deux enzymes métabolisent le même substrat, l'acide arachidonique, et qu'elles sont toutes les deux présentes à des niveaux élevés dans les cellules anucléées; les globules rouges pour 15-LOX et les plaquettes pour PGHS-1. L'ARNm de 15-LOX est synthétisé dans les précurseurs des érythrocytes situés dans la moelle osseuse, mais demeure non-traduit jusqu'à la maturation des réticulocytes en globules rouges (173). Le mécanisme par lequel la répression de la traduction a lieu est à présent connu, et implique une interaction spécifique dans la R3'NT de l'ARNm *15-LOX*. La séquence d'ARN est constituée d'un motif de 19 nts riche en pyrimidines et répété 10 fois (115). Les protéines fixant cette séquence ont été identifiées comme étant les protéines RNPhn K (66 kDa) et E1 (43 kDa) qui fonctionnent dans le cytoplasme à titre de régulateurs de la traduction de l'ARNm *15-LOX* (116). Plus précisément, la fixation des protéines RNPhn K et E1 à l'élément de la R3'NT de *15-LOX* prévient l'accumulation de la protéine 15-LOX en empêchant la jonction de la sous-unité ribosomale 60S au complexe d'initiation. De plus, des interactions entre la R5'NT et la R3'NT seraient impliquées (116;174). Cependant, la façon dont cette inhibition pourrait être abolie, afin de permettre l'accumulation de l'enzyme, n'est pas encore comprise. De manière semblable à l'exemple de *15-LOX*, la fixation de piARNm à l'élément-*cis* conservé dans la R3'NT de *PGHS-1* pourrait prévenir l'accumulation de la protéine,

cependant de quelle façon ces piARNm seraient impliquée dans le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle n'est pas encore établie.

Dans le cytoplasme, les ARNm sont retrouvés soit sous forme active dans les polysomes, soit sous forme inactive dans les complexes RNPm. La régulation de la proportion d'ARNm actif et non actif est un type de régulation traductionnelle (101). D'ailleurs, un transfert de l'ARNm des RNPm aux polysomes est un événement dominant dans le développement précoce de l'oursin de mer et la maturation des oocytes *Xenopus* (101). L'induction de la synthèse de PGHS-1 après 4 jrs de stimulation au TPA, sans changement dans les niveaux d'ARNm (Fig. 3.1), suggèrent que l'ARNm serait dans un état de traduction réprimée dans les MEG-01 +TPA-1jr. Cette observation suppose que cet ARNm inactif ne serait pas associé avec les ribosomes. Des expériences de fractionnement ont donc été menées pour déterminer si l'ARNm de PGHS-1 se trouvait sous forme de RNPm ou associé aux ribosomes. Les ARN totaux de MEG-01 stimulées pour 1 jr et 4 jrs, ont été fractionnés sur une solution de sucrose, puis chaque fraction fut analysée pour la présence d'ARNm *PGHS-1* (Fig. 3.15). Étonnamment, nous avons observé que les ARNm *PGHS-1*, dans les MEG-01 +TPA-1jr, tout comme dans les MEG-01 +TPA-4jrs, étaient retrouvés dans les fractions associées aux ribosomes; aucun transfert de l'ARNm *PGHS-1* de la fraction RNPm aux fractions ribosomales n'a été observé. Le fait de retrouver l'ARNm associé aux polysomes est généralement une indication de l'activité traductionnelle, pourtant, la protéine PGHS-1 n'est pas détectée dans les MEG-01 +TPA-1jr.

Une interprétation possible de ces résultats est que l'élongation du peptide naissant PGHS-1 est bloquée ou que la vitesse d'élongation est diminuée dans les MEG-01

+TPA-1jr, et il est probable que l'interaction protéique observée dans la R3'NT de PGHS-1 soit impliquée dans ce mécanisme. La synthèse de la protéine HSP70 dans les réticulocytes de poulet soumis à un choc thermique est un exemple d'un tel mécanisme (175). Par analyse sur gradient de sucrose, les auteurs ont montré que dans les cellules contrôles, tout comme dans les cellules ayant subi le choc thermique, l'ARNm était fonctionnellement associé au ribosomes. Toutefois, la synthèse protéique de HSP70 était faible dans les cellules contrôle et augmentait de 10x après le choc thermique, tandis que l'ARNm ne variait que légèrement. Les auteurs ont suggéré que la faible synthèse de HSP70 dans les cellules contrôles serait causée par une élongation plus lente du peptide naissant dans ces cellules par rapport aux cellules ayant subi le choc thermique. Cette régulation pourrait être médiée par un facteur présent dans les réticulocytes contrôles capable de fixer soit le peptide naissant ou l'ARNm *HSP70* (175). Un mécanisme de régulation au niveau de l'étape d'élongation a aussi été proposé pour l'ARNm de *Nos* dont la traduction est dépendante de plusieurs gènes, tels que *oskar* et *vasa* (176). Lorsque ces gènes sont mutés, *Nos* n'est pas traduit. Pourtant, l'ARNm *Nos* est tout de même retrouvé dans les fractions polysomales, ce qui suggère que la répression de la traduction aurait lieu après l'étape d'initiation (177). Le même raisonnement est venu d'un autre modèle impliquant la protéine bicaudal. Chez la drosophile, la protéine bicaudal est l'homologue de la sous-unité β du complexe NAC (*nascent-polypeptide-associated complex*) qui lie le peptide à sa sortie du ribosome. Lorsque le gène *bicaudal* est muté, *Nos* est traduit de manière ectopique; bicaudal aurait donc un rôle dans la répression de la traduction de *Nos* (112;113;178). Les auteurs ont proposé que si l'incapacité de ce complexe à lier le peptide était responsable pour le

manque de répression, alors la répression de la traduction devait avoir lieu au niveau de l'élongation (178). Or, un contrôle traductionnel spécifique à l'étape d'élongation ou de terminaison semble peu probable à priori. Tout d'abord, comme le même mécanisme de base est utilisé pour tous les ARNm lors des deux dernières étapes, ce mécanisme serait donc insensible à des séquences ou structures spécifiques d'ARNm particulier. De plus, l'inhibition de l'élongation d'ARNm spécifique résulterait en une utilisation inefficace des ribosomes non disponibles pour la traduction des autres ARNm (101).

À l'opposé de ce qui a été décrit auparavant, lorsque la répression de la traduction a lieu au niveau de l'initiation, l'ARNm est détecté dans la fraction des RNPM libres, tel que montré pour l'ARNm de 15-LOX (173). Cependant, avec les résultats que nous avons obtenus suite au fractionnement sur une solution de sucrose 30%, nous ne pouvons pas tirer de conclusions précises sur l'étape de traduction qui serait limitante dans la synthèse de PGHS-1. Afin de visualiser l'influence d'une stimulation au TPA sur la distribution de l'ARNm de PGHS-1 par rapport aux ribosomes, un fractionnement plus fin sur un gradient de sucrose 20-50% ainsi que la mesure continue de l'absorbance à 260 nm des fractions récoltées auraient permis d'observer non seulement la position des RNPM, mais celles des sous-unité 40S et 60S, ainsi que celles des complexes d'initiation 80S et des polysomes plus larges. Par conséquent, une variation dans la distribution de l'ARNm de PGHS-1 entre les cellules stimulées pour 1 et 4 jrs aurait pu être plus facilement observable.

Par ailleurs, l'analyse de la distribution d'ARNm sur gradient de sucrose peut parfois porter à la confusion puisque les RNPM qui ne sont pas associés avec l'appareil traductionnel demeurent souvent largement distribués entre les ARNm libres et les

polysomes assemblés, ceci s'amplifie avec l'augmentation de la taille des ARNm qui, même libres, peuvent par leur seule taille se retrouver dans les fractions dites associées aux ribosomes. Par ailleurs, il a été assumé que ces RNPm largement distribués, représenteraient des complexes contenant des ARNm qui sont compétents, mais non engagés dans la traduction (155). Il serait possible que l'ARNm de PGHS-1 se comporte ainsi. Alors, afin de s'assurer que l'ARNm *PGHS-1* retrouvé dans les fractions #3 à #5, après 1 jr de TPA (Fig. 3.15), est bien présent dans les polysomes, tel que les résultats le laissent supposer, l'ARN total pourrait être traité avec du EDTA avant d'être appliqué sur le gradient. En effet, le EDTA permet la dissociation des ribosomes de l'ARNm toutefois, il ne semble pas affecter les interactions ARN-protéine; il ne défait pas les RNPm. Avec ce traitement, il aurait été possible de déterminer si la présence de l'ARNm *PGHS-1* dans les fractions #3 à #5 était due à son association avec les polysomes ou à une association avec des protéines formant un complexe RNPm. Tel que démontré par fractionnement sur un gradient 10-60%, la protéine ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*) est retrouvée, soit sous forme libre, soit sous forme de complexes RNPm (complexe α) ou sous forme de complexes β , larges complexes résultant de l'association des complexes α avec les polysomes. Le traitement des cellules avec 20 mM de EDTA désorganise les complexes β , ce qui résulte en l'accumulation de la protéine ELAV dans les fractions représentant le complexe α (179). Enfin, pour quantifier plus directement l'efficacité traductionnelle de l'ARNm PGHS-1, une détection de la quantité de protéines nouvellement synthétisées en présence de méthionine marquée au S^{35} pourrait être utilisée. Tout d'abord, les cellules stimulées au TPA pour 1 jr ou 4 jrs seraient incubées avec la Met- S^{35} pour une période de 20 min.

Ensuite, la protéine PGHS-1 serait récupérée par immunoprécipitation puis analysée sur gels d'électrophorèse SDS afin de comparer les taux de synthèse de la protéine PGHS-1 radioactive après 1 jr et 4 jrs d'exposition au TPA.

De façon générale, les niveaux cellulaires de protéine à l'équilibre sont le résultat du taux de synthèse moins le taux de dégradation. Donc, le manque de protéine après 1 jr de TPA pourrait être dû à un taux élevé de dégradation et/ou à un faible taux de synthèse de la protéine. Par conséquent, une autre interprétation possible de nos résultats de fractionnement sur sucrose: l'ARNm *PGHS-1* présent dans les fractions ribosomales après 1 jr de stimulation au TPA, est que la protéine PGHS-1 est synthétisée efficacement, mais qu'elle est rapidement dégradée dans les MEG-1 +TPA-1jr. Dans le cytosol, les protéines peuvent être dégradées principalement, soit par les protéasomes ou par la voie des calpaines, ainsi que par les lysosomes, organelles remplis de protéases capables de dégrader les protéines en milieu acide.

Les protéasomes sont en majorité responsables de la protéolyse cellulaire spécifique. La dégradation des protéines par ce système requière qu'elles soient préalablement ubiquitinées, et l'ATP est également requis dans ce processus. Dans certains cas, les protéasomes pourraient également participer à la dégradation de base de protéines cytosoliques ou préalablement compartimentalisées. Toutefois, ils sont généralement responsables de la dégradation de protéines anormales ou ayant une durée de vie courte, qu'elles soient nucléaires ou cytoplasmiques, de la surface membranaire ou du réticulum endoplasmique (180). Plusieurs inhibiteurs spécifiques de ce système ont été développés, dont le MG-132 qui agit en bloquant les sites catalytiques de certaines protéases retrouvées dans les protéasomes. Les calpaines, quant à elles, sont

des protéases qui dégradent partiellement les protéines du cytosquelette ainsi que certaines enzymes associées à la membrane (181) et ce, indépendamment de l'ATP. L'activité des calpaines est modulée par la concentration intracellulaire de calcium, d'ailleurs, le PD 150606, utilisé dans les études d'inhibition, est dirigé vers les sites de liaison du calcium des calpaines, et inhibe ainsi ces protéases. Finalement, les protéines peuvent également être dégradées par les lysosomes qui sont capables de dégrader, en milieu acide, la plupart des macromolécules intra- et extracellulaires. Certaines protéines cytosoliques peuvent être transportées sélectivement à travers les membranes des lysosomes grâce à une séquence de cinq résidus incluant une glutamine à l'une des extrémités, telle que KFERQ (182). L'inhibiteur que nous avons utilisé ici, la chloroquine, pénètre facilement dans les lysosomes et augmente le pH intra-lysosomal, ce qui a pour effet d'inhiber les protéases acidiques.

Par l'utilisation de différents inhibiteurs des systèmes de dégradation intracellulaires, nous avons montré que la protéine PGHS-1 ne s'accumulait pas en présence d'aucun de ces inhibiteurs dans les extraits de MEG-01 +TPA-1jr (Fig. 3.16), suggérant que la dégradation rapide de la protéine dans les cellules MEG-01 +TPA-1jr n'était pas responsable du manque de PGHS-1. Notre observation que la protéine PGHS-1 n'est pas dégradée par les protéasomes est en accord avec une étude de Rockwell et al. qui ont rapporté que l'enzyme PGHS-1 était constitutivement exprimée dans les cellules neuronales HT4 et que ses niveaux n'étaient pas augmentés par le traitement avec des inhibiteurs de protéasomes (183). Des expériences pour mesurer la stabilité de la protéine *in vitro* devront d'être réalisées afin de déterminer si le TPA a un effet sur la stabilité de PGHS-1 dans les MEG-01. L'utilisation du cycloheximide, un

inhibiteur de la synthèse protéique, ajouté aux cellules pour différentes périodes de temps, pourrait nous indiquer si la durée de stimulation au TPA a un effet sur la stabilité de la protéine induite progressivement à partir de 2 jrs de stimulation.

Enfin, l'interaction spécifique que nous avons identifiée pourrait également influencer la localisation cytoplasmique de l'ARNm *PGHS-1*. Dans l'exemple de la drosophile, la localisation de l'ARNm *Bcd* au pôle antérieur de l'oocyte, joue un rôle prédominant dans le développement de l'axe antéro-postérieur et dépend d'interactions protéiques dans la R3'NT de *Bcd* ainsi que des microtubules (97). De la même façon, il a été démontré que des complexes ELAV-RNPm s'associaient avec les microtubules (179). Les auteurs ont suggéré que la protéine ELAV complexée à un ARNm pourrait influencer la régulation post-transcriptionnelle de ce dernier en modulant son transport intracellulaire, sa localisation et sa traduction. D'ailleurs, la localisation des ARNm dans des endroits ciblés de la cellule serait un mécanisme de contrôle qui nécessiterait beaucoup moins d'énergie que la localisation ultérieure des protéines correspondantes (92).

Lors de la différenciation des mégacaryocytes, la structure du cytoplasme des cellules mégacaryoblastiques se transforme (10), et cette transformation pourrait influencer la localisation des ARNm (rôle de la 3'UTR) ou bien de l'appareil traductionnel (rôle du cytosquelette). La ségrégation de la machinerie traductionnelle dans les MEG-01 non-stimulées pourrait même expliquer la synthèse limitée de protéine PGHS-1. Par microscopie immunoélectronique, l'enzyme PGHS-1 a été localisée dans le réticulum endoplasmique (ou DMS) des MEG-01 +TPA-4jrs (136). Par ailleurs, vers la fin de leur maturation, les mégacaryocytes contiennent un système membranaire

(DMS) très développé et leur cytoplasme est subdivisé en plaquettes (10). C'est donc une hypothèse attrayante d'imaginer que le DMS pourrait servir d'échafaud pour concentrer la synthèse de PGHS-1 à l'endroit où les plaquettes bourgeonnent des cellules mères et ce, via le cytosquelette et des interactions protéiques dans la R3'NT de l'ARNm *PGHS-1*, qui concentreraient l'ARNm au niveau du DMS, sous forme inactive jusqu'au moment où la synthèse de protéine PGHS-1 serait nécessaire.

4.4 Perspectives et pharmacologie

Il est bien établi que les plaquettes représentent une des plus riches sources d'enzyme PGHS-1 dans le corps, toutefois, l'importance de la régulation post-transcriptionnelle dans l'expression du gène *PGHS-1* dans les plaquettes n'est que spéculative pour l'instant. Les observations que nous avons faites dans les MEG-01 stimulées pour 1 jr au TPA, nous ont suggéré que l'absence de protéines n'était pas causé par sa dégradation, mais plutôt par une synthèse inefficace reliée à l'inactivité de la machinerie traductionnelle aux premiers jours de stimulation avec le TPA. Pour quelle raison un tel délai dans la traduction de PGHS-1 au cours de la différenciation des mégacaryocytes serait nécessaire n'est pas établie; la seule fonction connue pour PGHS-1 dans les cellules mégacaryocytes étant de médier l'agrégation des plaquettes, leur forme la plus différenciée. Cependant, nous pouvons considérer que si toutes les plaquettes sont libérées en même temps d'une cellule mégacaryocyte, cela signifie qu'une énorme quantité d'enzyme PGHS-1 doit avoir été synthétisée et qu'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *PGHS-1* est plus économique, en temps et en énergie, pour la cellule. Selon notre modèle (Fig. 4.1), lorsque la différenciation

des cellules précurseurs est entraînée par des facteurs hématopoïétiques, les niveaux d'ARNm de PGHS-1 augmentent rapidement, tandis que l'accumulation de protéine est retardée jusqu'à ce que les cellules aient atteint le stade de libération des plaquettes. Par conséquent, au dernier stage de différenciation, la dissociation des piARNm-PGHS-1 de l'élément-*cis* de 20 nts dans la R3'NT permettrait une augmentation dans l'efficacité de traduction expliquant l'enrichissement de cette enzyme dans les plaquettes.

En pharmacologie, le traitement de la douleur et des autres signes inflammatoires ne représentent qu'un aspect de l'utilisation des NSAID. En effet, l'Aspirin a aussi un effet anti-plaquettaire causé par l'inactivation irréversible de l'enzyme PGHS-1 des plaquettes (6). Par contre, les effets bénéfiques des NSAID sont aussi associés à des effets secondaires, tels que l'ulcération gastro-intestinale et la toxicité rénale (184;185). Étant donné l'usage répandu des NSAID, les risques pour la santé associés à la prise de ces médicaments sont parmi les plus prévalents (4). Par conséquent, la description des étapes menant à l'atteinte du fort niveau d'expression de PGHS-1 dans les plaquettes pourrait être très utile pour élaborer des stratégies alternatives à l'Aspirin dans la prévention des décès causés par les complications cardiovasculaires associées avec une hyperfonction des plaquettes. Par ailleurs, l'identification par notre laboratoire, d'une patiente avec une déficience importante (90%) dans les niveaux d'enzyme PGHS-1 (186), ayant pourtant des niveaux d'ARNm *PGHS-1* normaux, supporte l'idée que la régulation post-transcriptionnelle est significative et réitère l'importance de comprendre les mécanismes régulant l'expression du gène *PGHS-1* dans les plaquettes.

RÉFÉRENCES

1. Smith,W.L. and Laneuville,O. 1994. Cyclooxygenase and Lipoxygenase Pathways of arachidonate Acid Metabolism. In *Prostaglandin Inhibitors in Tumor Immunology and Immunotherapy*. Harris JE, Braun DP, and Anderson KM, editors. CRC Press, Boca Raton. 1-16.
2. Vane,J.R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat.New Biol.* 231:232-235.
3. Vane,J.R. and Botting,R.M. 1998. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am.J.Med.* 104:2S-8S.
4. Dewitt,D.L. 1999. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol.Pharmacol.* 55:625-631.
5. Willard,J.E., Lange,R.A., and Hillis,L.D. 1992. The use of aspirin in ischemic heart disease. *N.Engl.J.Med.* 327:175-181.
6. Patrono,C. 1994. Aspirin as an antiplatelet drug. *N.Engl.J.Med.* 330:1287-1294.
7. Roth,G.J., Stanford,N., and Majerus,P.W. 1975. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72:3073-3076.
8. Hamberg,M., Svensson,J., and Samuelsson,B. 1975. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72:2994-2998.
9. Smith,W.L., Dewitt,D.L., and Garavito,R.M. 2000. CYCLOOXYGENASES: structural, cellular, and molecular biology. *Annu.Rev.Biochem.* 69:145-182.
10. Breton-Gorius,J. and Vainchenker,W. 1986. Expression of platelet proteins during the in vitro and in vivo differentiation of megakaryocytes and morphological aspects of their maturation. *Semin.Hematol.* 23:43-67.
11. Ogura,M., Morishima,Y., Okumura,M., Hotta,T., Takamoto,S., Ohno,R., Hirabayashi,N., Nagura,H., and Saito,H. 1988. Functional and morphological differentiation induction of a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01s) by phorbol diesters. *Blood* 72:49-60.
12. Plant,M.H. and Laneuville,O. 1999. Characterization of a novel transcript of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 with a tissue-specific profile of expression. *Biochem.J.* 344 Pt 3:677-685.
13. Miyamoto,T., Ogino,N., Yamamoto,S., and Hayaishi,O. 1976. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J.Biol.Chem.* 251:2629-2636.

14. Kujubu,D.A., Fletcher,B.S., Varnum,B.C., Lim,R.W., and Herschman,H.R. 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J.Biol.Chem.* 266:12866-12872.
15. Vane,J.R., Bakhle,Y.S., and Botting,R.M. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 38:97-120.
16. Herschman,H.R. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim.Biophys.Acta* 1299:125-140.
17. Smith,W.L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am.J.Physiol* 263:F181-F191.
18. Zhou,L. and Nilsson,A. 2001. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J.Lipid Res.* 42:1521-1542.
19. Murakami,M., Kambe,T., Shimbara,S., and Kudo,I. 1999. Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J.Biol.Chem.* 274:3103-3115.
20. Swinney,D.C., Mak,A.Y., Barnett,J., and Ramesha,C.S. 1997. Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J.Biol.Chem.* 272:12393-12398.
21. Ikai,K. and Imamura,S. 1988. Prostaglandin D2 in the skin. *Int.J.Dermatol.* 27:141-149.
22. Lewis,R.A. and Austen,K.F. 1981. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature* 293:103-108.
23. Murakami,M., Matsumoto,R., Austen,K.F., and Arm,J.P. 1994. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D2 in mouse bone marrow- derived mast cells. *J.Biol.Chem.* 269:22269-22275.
24. Whittle,B.J., Moncada,S., and Vane,J.R. 1978. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI2), prostaglandin E1 and D2 on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins* 16:373-388.
25. Mene,P., Simonson,M.S., and Dunn,M.J. 1989. Phospholipids in signal transduction of mesangial cells. *Am.J.Physiol* 256:F375-F386.
26. Grenier,F.C., Rollins,T.E., and Smith,W.L. 1981. Kinin-induced prostaglandin synthesis by renal papillary collecting tubule cells in culture. *Am.J.Physiol* 241:F94-104.

27. Smith,W.L. 1989. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem.J.* 259:315-324.
28. Aly,A., Green,K., and Johansson,C. 1987. Prostaglandin synthesis in the human gastrointestinal mucosa. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 127:35-38.
29. Hansen,W.R., Keelan,J.A., Skinner,S.J., and Mitchell,M.D. 1999. Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues: a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 57:243-257.
30. Gavett,S.H., Madison,S.L., Chulada,P.C., Scarborough,P.E., Qu,W., Boyle,J.E., Tiano,H.F., Lee,C.A., Langenbach,R., Roggli,V.L. *et al.* 1999. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase- deficient mice. *J.Clin.Invest* 104:721-732.
31. Dewitt,D.L., Day,J.S., Sonnenburg,W.K., and Smith,W.L. 1983. Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I₂ synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J.Clin.Invest* 72:1882-1888.
32. Whittle,B.J., Higgs,G.A., Eakins,K.E., Moncada,S., and Vane,J.R. 1980. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 284:271-273.
33. Ellis,E.F., Oelz,O., Roberts,L.J., Payne,N.A., Sweetman,B.J., Nies,A.S., and Oates,J.A. 1976. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A₂. *Science* 193:1135-1137.
34. Laneuville,O., Breuer,D.K., Dewitt,D.L., Hla,T., Funk,C.D., and Smith,W.L. 1994. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases- 1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 271:927-934.
35. Shimokawa,T. and Smith,W.L. 1992. Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region. *J.Biol.Chem.* 267:12387-12392.
36. Smith,W.L. and Dewitt,D.L. 1995. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin.Nephrol.* 15:179-194.
37. Yokoyama,C., Takai,T., and Tanabe,T. 1988. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* 231:347-351.
38. Yokoyama,C. and Tanabe,T. 1989. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 165:888-894.

39. Dewitt,D.L., el Harith,E.A., Kraemer,S.A., Andrews,M.J., Yao,E.F., Armstrong,R.L., and Smith,W.L. 1990. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J.Biol.Chem.* 265:5192-5198.
40. Dewitt,D.L. and Smith,W.L. 1988. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:1412-1416.
41. Van der Ouderaa,F.J., Buytenhek,M., Nugteren,D.H., and Van Dorp,D.A. 1977. Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim.Biophys.Acta* 487:315-331.
42. Mutsaers,J.H., van Halbeek,H., Kamerling,J.P., and Vliegthart,J.F. 1985. Determination of the structure of the carbohydrate chains of prostaglandin endoperoxide synthase from sheep. *Eur.J.Biochem.* 147:569-574.
43. Merlie,J.P., Fagan,D., Mudd,J., and Needleman,P. 1988. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J.Biol.Chem.* 263:3550-3553.
44. Otto,J.C., Dewitt,D.L., and Smith,W.L. 1993. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 268:18234-18242.
45. Song,I. and Smith,W.L. 1996. C-terminal Ser/Pro-Thr-Glu-Leu tetrapeptides of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 target the enzymes to the endoplasmic reticulum. *Arch.Biochem.Biophys.* 334:67-72.
46. Rollins,T.E. and Smith,W.L. 1980. Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *J.Biol.Chem.* 255:4872-4875.
47. Dewitt,D.L., Rollins,T.E., Day,J.S., Gauger,J.A., and Smith,W.L. 1981. Orientation of the active site and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 256:10375-10382.
48. Otto,J.C. and Smith,W.L. 1994. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 269:19868-19875.
49. Spencer,A.G., Woods,J.W., Arakawa,T., Singer,I.I., and Smith,W.L. 1998. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J.Biol.Chem.* 273:9886-9893.

50. Picot,D., Loll,P.J., and Garavito,R.M. 1994. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1 [see comments]. *Nature* 367:243-249.
51. Blobel,G. 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:1496-1500.
52. Spencer,A.G., Thuresson,E., Otto,J.C., Song,I., Smith,T., Dewitt,D.L., Garavito,R.M., and Smith,W.L. 1999. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. *J.Biol.Chem.* 274:32936-32942.
53. Xiao,G., Chen,W., and Kulmacz,R.J. 1998. Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and - 2. *J.Biol.Chem.* 273:6801-6811.
54. Smith,W.L. and Lands,W.E. 1972. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 11:3276-3285.
55. Mizuno,K., Yamamoto,S., and Lands,W.E. 1982. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins* 23:743-757.
56. Dietz,R., Nastainczyk,W., and Ruf,H.H. 1988. Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2. *Eur.J.Biochem.* 171:321-328.
57. Landino,L.M., Crews,B.C., Gierse,J.K., Hauser,S.D., and Marnett,L.J. 1997. Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J.Biol.Chem.* 272:21565-21574.
58. Shimokawa,T. and Smith,W.L. 1991. Essential histidines of prostaglandin endoperoxide synthase. His-309 is involved in heme binding. *J.Biol.Chem.* 266:6168-6173.
59. Shimokawa,T., Kulmacz,R.J., Dewitt,D.L., and Smith,W.L. 1990. Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. *J.Biol.Chem.* 265:20073-20076.
60. Mancini,J.A., Riendeau,D., Falgueyret,J.P., Vickers,P.J., and O'Neill,G.P. 1995. Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J.Biol.Chem.* 270:29372-29377.
61. Roth,G.J. and Siok,C.J. 1978. Acetylation of the NH2-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin. *J.Biol.Chem.* 253:3782-3784.

62. Funk,C.D., Funk,L.B., Kennedy,M.E., Pong,A.S., and FitzGerald,G.A. 1991. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 5:2304-2312.
63. Kraemer,S.A., Meade,E.A., and Dewitt,D.L. 1992. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch.Biochem.Biophys.* 293:391-400.
64. Wang,L.H., Hajibeigi,A., Xu,X.M., Loose-Mitchell,D., and Wu,K.K. 1993. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 190:406-411.
65. Xu,X.M., Tang,J.L., Chen,X., Wang,L.H., and Wu,K.K. 1997. Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J.Biol.Chem.* 272:6943-6950.
66. Dewitt,D.L. and Meade,E.A. 1993. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch.Biochem.Biophys.* 306:94-102.
67. Masferrer,J.L., Reddy,S.T., Zweifel,B.S., Seibert,K., Needleman,P., Gilbert,R.S., and Herschman,H.R. 1994. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 270:1340-1344.
68. Xu,X.M., Tang,J.L., Hajibeigi,A., Loose-Mitchell,D.S., and Wu,K.K. 1996. Transcriptional regulation of endothelial constitutive PGHS-1 expression by phorbol ester. *Am.J.Physiol* 270:C259-C264.
69. Hla,T. 1996. Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins* 51:81-85.
70. Langenbach,R., Morham,S.G., Tiano,H.F., Loftin,C.D., Ghanayem,B.I., Chulada,P.C., Mahler,J.F., Lee,C.A., Goulding,E.H., and Kluckman,K.D. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83:483-492.
71. Dinchuk,J.E., Car,B.D., Focht,R.J., Johnston,J.J., Jaffee,B.D., Covington,M.B., Contel,N.R., Eng,V.M., Collins,R.J., Czerniak,P.M. *et al.* 1995. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378:406-409.
72. Gross,G., Imamura,T., Vogt,S.K., Wozniak,D.F., Nelson,D.M., Sadovsky,Y., and Muglia,L.J. 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278:R1415-R1423.

73. Brannon,T.S., North,A.J., Wells,L.B., and Shaul,P.W. 1994. Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J.Clin.Invest* 93:2230-2235.
74. Tsuchiya,S., Kobayashi,Y., Goto,Y., Okumura,H., Nakae,S., Konno,T., and Tada,K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42:1530-1536.
75. Sanduja,S.K., Mehta,K., Xu,X.M., Hsu,S.M., Sanduja,R., and Wu,K.K. 1991. Differentiation-associated expression of prostaglandin H and thromboxane A synthases in monocytoid leukemia cell lines. *Blood* 78:3178-3185.
76. Smith,C.J., Morrow,J.D., Roberts,L.J., and Marnett,L.J. 1993. Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 192:787-793.
77. Schneider,N., Lanz,S., Ramer,R., Schaefer,D., and Goppelt-Struebe,M. 2001. Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *J.Neurochem.* 77:416-424.
78. Wickens,M., Anderson,P., and Jackson,R.J. 1997. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 7:220-232.
79. Pallier C. 2001. Les régions non traduites des ARN messagers et leur rôles dans la synthèse protéique. *Médecine/Sciences* 17:23-32.
80. Chen,C.Y. and Shyu,A.B. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.Sci.* 20:465-470.
81. Muhlrad,D. and Parker,R. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370:578-581.
82. Peng,S.S., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. 1996. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c- jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol.Cell Biol.* 16:1490-1499.
83. Lagnado,C.A., Brown,C.Y., and Goodall,G.J. 1994. AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol.Cell Biol.* 14:7984-7995.
84. Shaw,G. and Kamen,R. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659-667.
85. Hamilton,B.J., Burns,C.M., Nichols,R.C., and Rigby,W.F. 1997. Modulation of AUUUA response element binding by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

- A1 in human T lymphocytes. The roles of cytoplasmic location, transcription, and phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 272:28732-28741.
86. Zhang,W., Wagner,B.J., Ehrenman,K., Schaefer,A.W., DeMaria,C.T., Crater,D., DeHaven,K., Long,L., and Brewer,G. 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol.Cell Biol.* 13:7652-7665.
 87. Brewer,G. 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol.Cell Biol.* 11:2460-2466.
 88. Buzby,J.S., Brewer,G., and Nugent,D.J. 1999. Developmental regulation of RNA transcript destabilization by A + U- rich elements is AUF1-dependent. *J.Biol.Chem.* 274:33973-33978.
 89. Sela-Brown,A., Silver,J., Brewer,G., and Naveh-Many,T. 2000. Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability. *J.Biol.Chem.* 275:7424-7429.
 90. Ai,L.S. and Chau,L.Y. 1999. Post-transcriptional regulation of H-ferritin mRNA. Identification of a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region associated with message stability in human monocytic THP-1 cells. *J.Biol.Chem.* 274:30209-30214.
 91. Binder,R., Horowitz,J.A., Basilion,J.P., Koeller,D.M., Klausner,R.D., and Harford,J.B. 1994. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J.* 13:1969-1980.
 92. St Johnston,D. 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81:161-170.
 93. Bashirullah,A., Cooperstock,R.L., and Lipshitz,H.D. 1998. RNA localization in development. *Annu.Rev.Biochem.* 67:335-394.
 94. Gavis,E.R. and Lehmann,R. 1992. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71:301-313.
 95. Murata,Y. and Wharton,R.P. 1995. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos. *Cell* 80:747-756.
 96. St Johnston,D., Driever,W., Berleth,T., Richstein,S., and Nusslein-Volhard,C. 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte. *Development* 107 Suppl:13-19.
 97. Pokrywka,N.J. and Stephenson,E.C. 1991. Microtubules mediate the localization of bicoid RNA during Drosophila oogenesis. *Development* 113:55-66.

98. Ferrandon,D., Elphick,L., Nusslein-Volhard,C., and St Johnston,D. 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
99. Wang,S. and Hazelrigg,T. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369:400-403.
100. Schumacher,J.M., Lee,K., Edelhoff,S., and Braun,R.E. 1995. Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J.Cell Biol.* 129:1023-1032.
101. Hershey,J.W. 1991. Translational control in mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.* 60:717-755.
102. Day,D.A. and Tuite,M.F. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J.Endocrinol.* 157:361-371.
103. Iizuka,N., Najita,L., Franzusoff,A., and Sarnow,P. 1994. Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 14:7322-7330.
104. Bernstein,J., Shefler,I., and Elroy-Stein,O. 1995. The translational repression mediated by the platelet-derived growth factor 2/c-sis mRNA leader is relieved during megakaryocytic differentiation. *J.Biol.Chem.* 270:10559-10565.
105. Olsen,P.H. and Ambros,V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev.Biol.* 216:671-680.
106. Galili,G., Kawata,E.E., Smith,L.D., and Larkins,B.A. 1988. Role of the 3'-poly(A) sequence in translational regulation of mRNAs in *Xenopus laevis* oocytes. *J.Biol.Chem.* 263:5764-5770.
107. Munroe,D. and Jacobson,A. 1990. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol.Cell Biol.* 10:3441-3455.
108. Wells,S.E., Hillner,P.E., Vale,R.D., and Sachs,A.B. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol.Cell* 2:135-140.
109. Tarun,S.Z., Jr. and Sachs,A.B. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* 15:7168-7177.
110. Lie,Y.S. and Macdonald,P. 1999. Translational regulation of *oskar* mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in *Drosophila* ovarian extracts. *Development* 126:4989-4996.

111. Gallie,D.R., Lewis,N.J., and Marzluff,W.F. 1996. The histone 3'-terminal stem-loop is necessary for translation in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res.* 24:1954-1962.
112. Gavis,E.R., Lunsford,L., Bergsten,S.E., and Lehmann,R. 1996. A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development* 122:2791-2800.
113. Smibert,C.A., Wilson,J.E., Kerr,K., and Macdonald,P.M. 1996. smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. *Genes Dev.* 10:2600-2609.
114. Bergsten,S.E. and Gavis,E.R. 1999. Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development* 126:659-669.
115. Ostareck-Lederer,A., Ostareck,D.H., Standart,N., and Thiele,B.J. 1994. Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.* 13:1476-1481.
116. Ostareck,D.H., Ostareck-Lederer,A., Wilm,M., Thiele,B.J., Mann,M., and Hentze,M.W. 1997. mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89:597-606.
117. Piecyk,M., Wax,S., Beck,A.R., Kedersha,N., Gupta,M., Maritim,B., Chen,S., Gueydan,C., Kruys,V., Streuli,M. *et al* . 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 19:4154-4163.
118. Kruys,V. and Huez,G. 1994. Translational control of cytokine expression by 3' UA-rich sequences. *Biochimie* 76:862-866.
119. de Sauvage,F.J., Villeval,J.L., and Shivdasani,R.A. 1998. Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production: lessons from animal models. *J.Lab Clin.Med.* 131:496-501.
120. Italiano,J.E., Jr., Lecine,P., Shivdasani,R.A., and Hartwig,J.H. 1999. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J.Cell Biol.* 147:1299-1312.
121. Radley,J.M. and Haller,C.J. 1982. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 60:213-219.
122. Falcieri,E., Bassini,A., Pierpaoli,S., Luchetti,F., Zamai,L., Vitale,M., Guidotti,L., and Zauli,G. 2000. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat.Rec.* 258:90-99.
123. Breton-Gorius,J. and Guichard,J. 1972. Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. *Am.J.Pathol.* 66:277-293.

124. Carey,F., Menashi,S., and Crawford,N. 1982. Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes. *Biochem.J.* 204:847-851.
125. Gerrard,J.M., White,J.G., Rao,G.H., and Townsend,D. 1976. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am.J.Pathol.* 83:283-298.
126. Hamroun,D., Mathieu,M.N., and Chevillard,C. 1998. Change of endothelin receptor subtype in the MEG-01 human megakaryoblastic cell line. *Eur.J.Pharmacol.* 344:307-312.
127. Nagata,K., Okano,Y., and Nozawa,Y. 1997. Differential expression of low Mr GTP-binding proteins in human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, and their possible involvement in the differentiation process. *Thromb.Haemost.* 77:368-375.
128. Deutsch,V., Bitan,M., Friedmann,Y., Eldor,A., and Vlodavsky,I. 2000. Megakaryocyte maturation is associated with expression of the CXC chemokine connective tissue-activating peptide CTAP III. *Br.J.Haematol.* 111:1180-1189.
129. Ogura,M., Morishima,Y., Ohno,R., Kato,Y., Hirabayashi,N., Nagura,H., and Saito,H. 1985. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG- 01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 66:1384-1392.
130. Murate,T., Saga,S., Hamaguchi,M., Asano,H., Ito,T., Watanabe,T., Adachi,K., Koizumi,K.T., Yoshida,S., Saito,H. *et al.* 1995. Herbimycin A inhibits phorbol ester-induced morphologic changes, adhesion, and megakaryocytic differentiation of the leukemia cell line, MEG-01. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 209:270-278.
131. Leven,R.M. 1995. Differential regulation of integrin-mediated proplatelet formation and megakaryocyte spreading. *J.Cell Physiol* 163:597-607.
132. Long,M.W., Smolen,J.E., Szczepanski,P., and Boxer,L.A. 1984. Role of phorbol diesters in in vitro murine megakaryocyte colony formation. *J.Clin.Invest* 74:1686-1692.
133. Sanz,C., Benet,I., Richard,C., Badia,B., Andreu,E.J., Prosper,F., and Fernandez-Luna,J.L. 2001. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp.Hematol.* 29:728-735.
134. Zhan,X., Haudenschild,C.C., Ni,Y., Smith,E., and Huang,C. 1997. Upregulation of cortactin expression during the maturation of megakaryocytes. *Blood* 89:457-464.
135. Krichevsky,A.M., Metzger,E., and Rosen,H. 1999. Translational control of specific genes during differentiation of HL-60 cells. *J.Biol.Chem.* 274:14295-14305.

136. Mroske,C., Plant,M.H., Franks,D.J., and Laneuville,O. 2000. Characterization of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 enzyme expression during differentiation of the megakaryocytic cell line MEG- 01. *Exp.Hematol.* 28:411-421.
137. Komatsu,N., Suda,T., Moroi,M., Tokuyama,N., Sakata,Y., Okada,M., Nishida,T., Hirai,Y., Sato,T., Fuse,A. *et al.* 1989. Growth and differentiation of a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Blood* 74:42-48.
138. Ueda,N., Yamashita,R., Yamamoto,S., and Ishimura,K. 1997. Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakaryoblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester. *Biochim.Biophys.Acta* 1344:103-110.
139. Matijevic-Aleksic,N., Sanduja,S.K., Wang,L.H., and Wu,K.K. 1995. Differential expression of thromboxane A synthase and prostaglandin H synthase in megakaryocytic cell line. *Biochim.Biophys.Acta* 1269:167-175.
140. Dignam,J.D. 1990. Preparation of Extracts from Higher Eukaryotes. *Method in Enzymology* 182:194-203.
141. Shetty,S. and Idell,S. 2000. Post-transcriptional regulation of urokinase mRNA. Identification of a novel urokinase mRNA-binding protein in human lung epithelial cells in vitro. *J.Biol.Chem.* 275:13771-13779.
142. Wilusz J. 1998. Detecting RNA:protein interactions and isolating cDNA clones by Northwestern screening. In *RNA:Protein Interactions: a practical approach*. Smith CWJ, editor. Oxford University Press Inc., New York. 185-187.
143. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. Extraction, Purification, and Analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. In *Molecular cloning : a laboratory manual* . Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 7.70.
144. Garcia-Sanz,J.A., Mikulits,W., Livingstone,A., Lefkovits,I., and Mullner,E.W. 1998. Translational control: a general mechanism for gene regulation during T cell activation. *FASEB J.* 12:299-306.
145. Varani,L., Gunderson,S.I., Mattaj,I.W., Kay,L.E., Neuhaus,D., and Varani,G. 2000. The NMR structure of the 38 kDa U1A prot. *Nat.Struct.Biol.* 7:329-335.
146. Varani,G. and Nagai,K. 1998. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 27:407-445.
147. Gross-Mesilaty,S., Reinstein,E., Bercovich,B., Tobias,K.E., Schwartz,A.L., Kahana,C., and Ciechanover,A. 1998. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:8058-8063.

148. Dorn,G.W., Davis,M.G., and D'Angelo,D.D. 1994. Gene expression during phorbol ester-induced differentiation of cultured human megakaryoblastic cells. *Am.J.Physiol* 266:C1231-C1239.
149. Plant MH. 1999. Characterization of a novel prostaglandin endoperoxide H synthase-1 transcript and examination of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 expression. 81-84.. Master Thesis, University of Ottawa.
150. Silvia,W.J., Lee,J.S., Trammell,D.S., Hayes,S.H., Lowberger,L.L., and Brockman,J.A. 1994. Cellular mechanisms mediating the stimulation of ovine endometrial secretion of prostaglandin F2 alpha in response to oxytocin: role of phospholipase C and diacylglycerol. *J.Endocrinol.* 141:481-490.
151. Kawasaki,M., Yoshihara,Y., Yamaji,M., and Watanabe,Y. 1993. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase in rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 19:39-46.
152. Peri,K.G., Hardy,P., Li,D.Y., Varma,D.R., and Chemtob,S. 1995. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J.Biol.Chem.* 270:24615-24620.
153. Norton,J.L., Adamson,S.L., Bocking,A.D., and Han,V.K. 1996. Prostaglandin-H synthase-1 (PGHS-1) gene is expressed in specific neurons of the brain of the late gestation ovine fetus. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 95:79-96.
154. Samet,J.M., Fasano,M.B., Fonteh,A.N., and Chilton,F.H. 1995. Selective induction of prostaglandin G/H synthase I by stem cell factor and dexamethasone in mast cells. *J.Biol.Chem.* 270:8044-8049.
155. Keene,J.D. 2001. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:7018-7024.
156. Nevins,J.R. 1983. The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annu.Rev.Biochem.* 52:441-466.
157. Diaz,A., Chepenik,K.P., Korn,J.H., Reginato,A.M., and Jimenez,S.A. 1998. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp.Cell Res.* 241:222-229.
158. You,Y., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. 1992. U-rich sequence-binding proteins (URBPs) interacting with a 20- nucleotide U-rich sequence in the 3' untranslated region of c-fos mRNA may be involved in the first step of c-fos mRNA degradation. *Mol.Cell Biol.* 12:2931-2940.

159. Tholanikunnel,B.G. and Malbon,C.C. 1997. A 20-nucleotide (A + U)-rich element of beta2-adrenergic receptor (beta2AR) mRNA mediates binding to beta2AR-binding protein and is obligate for agonist-induced destabilization of receptor mRNA. *J.Biol.Chem.* 272:11471-11478.
160. Fraboulet,S., Boudouresque,F., Delfino,C., and Ouafik,L. 1998. Identification of a novel cis-element in the 3'-untranslated region of mammalian peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 139:894-904.
161. Amara,F.M., Chen,F.Y., and Wright,J.A. 1994. Phorbol ester modulation of a novel cytoplasmic protein binding activity at the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase R2 mRNA and role in message stability. *J.Biol.Chem.* 269:6709-6715.
162. Blaxall,B.C., Pellett,A.C., Wu,S.C., Pende,A., and Port,J.D. 2000. Purification and characterization of beta-adrenergic receptor mRNA- binding proteins. *J.Biol.Chem.* 275:4290-4297.
163. Tadauchi,T., Matsumoto,K., Herskowitz,I., and Irie,K. 2001. Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO J.* 20:552-561.
164. Perez-Canadillas,J.M. and Varani,G. 2001. Recent advances in RNA-protein recognition. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11:53-58.
165. Dreyfuss,G., Matunis,M.J., Pinol-Roma,S., and Burd,C.G. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu.Rev.Biochem.* 62:289-321.
166. Ramos,A., Grunert,S., Adams,J., Micklem,D.R., Proctor,M.R., Freund,S., Bycroft,M., St Johnston,D., and Varani,G. 2000. RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.* 19:997-1009.
167. Siomi,H., Matunis,M.J., Michael,W.M., and Dreyfuss,G. 1993. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21:1193-1198.
168. Biamonti,G. and Riva,S. 1994. New insights into the auxiliary domains of eukaryotic RNA binding proteins. *FEBS Lett.* 340:1-8.
169. Katz,D.A., Theodorakis,N.G., Cleveland,D.W., Lindsten,T., and Thompson,C.B. 1994. AU-A, an RNA-binding activity distinct from hnRNP A1, is selective for AUUUA repeats and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* 22:238-246.
170. Swanson,M.S. and Dreyfuss,G. 1988. RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *EMBO J.* 7:3519-3529.

171. Soulard,M., Della,V., V, Siomi,M.C., Pinol-Roma,S., Codogno,P., Bauvy,C., Bellini,M., Lacroix,J.C., Monod,G., Dreyfuss,G. *et al.* 1993. hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 21:4210-4217.
172. Ishikawa,F., Matunis,M.J., Dreyfuss,G., and Cech,T.R. 1993. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)n. *Mol.Cell Biol.* 13:4301-4310.
173. Thiele,B.J., Andree,H., Hohne,M., and Rapoport,S.M. 1982. Lipoygenase mRNA in rabbit reticulocytes. Its isolation, characterization and translational repression. *Eur.J.Biochem.* 129:133-141.
174. Ostareck,D.H., Ostareck-Lederer,A., Shatsky,I.N., and Hentze,M.W. 2001. Lipoygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104:281-290.
175. Theodorakis,N.G., Banerji,S.S., and Morimoto,R.I. 1988. HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *J.Biol.Chem.* 263:14579-14585.
176. Gavis,E.R. and Lehmann,R. 1994. Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature* 369:315-318.
177. Clark,I.E., Wyckoff,D., and Gavis,E.R. 2000. Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr.Biol.* 10:1311-1314.
178. Markesich,D.C., Gajewski,K.M., Nazimiec,M.E., and Beckingham,K. 2000. bicaudal encodes the Drosophila beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* 127:559-572.
179. Antic,D. and Keene,J.D. 1998. Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 2):183-197.
180. Kornitzer,D. and Ciechanover,A. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J.Cell Physiol* 182:1-11.
181. Croall,D.E. and DeMartino,G.N. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 71:813-847.
182. Dice,J.F. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem.Sci.* 15:305-309.
183. Rockwell,P., Yuan,H., Magnusson,R., and Figueiredo-Pereira,M.E. 2000. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin

conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch.Biochem.Biophys.* 374:325-333.

184. Warner,T.D., Giuliano,F., Vojnovic,I., Bukasa,A., Mitchell,J.A., and Vane,J.R. 1999. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:7563-7568.
185. Bennett,W.M., Henrich,W.L., and Stoff,J.S. 1996. The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. *Am.J.Kidney Dis.* 28:S56-S62.
186. Dube,J.N., Drouin,J., Aminian,M., Plant,M.H., and Laneuville,O. 2001. Characterization of a partial prostaglandin endoperoxide H synthase-1 deficiency in a patient with a bleeding disorder. *Br.J.Haematol.* 113:878-885.

ANNEXE I

Alignement des séquences des 1000 premiers nts de la R'3NT de PGHS-1

```

Souris      1  TGAGGGGCTGGAAAGCAGC-CTCTGGAGGGAGGAGTTTGT-----TCCTGA---
Rat         1  TGAGGGGCT-----C-TCCTGGAGGGAGGAGTTTGT-----TCCTGA---
Humain      1  TGAGGGGCGAGGAAAGCAGCATCTGGAGGGGAGAGCTTGTGCTTGTTCATTCCAGAGTG
Mouton      1  TGAAGGGGCCGGGCAGCAGCATCTGGATGGTAGAGCTTCCTGCTTGCATTCCAGA---
consensus   1  ***.**.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris      48  -TGAAGACA-----GTGCTTGATGTGGGTTTCCTGGCTTGGCATTGTGAGAGC
Rat         38  -AGAAGACA-----GTGCTTGATGTGGGTTT-CTGGCTGGGCATTGTGAGAGC
Humain      60  CTGAGGCCAGGGCT--GATGGTCTTAATGCTCTCTTTTC-TGGTTTGGCATGTGAGTGT
Mouton      58  ---ATGCCACGGGGTGATGTCTTTGATGTGGCTTC-TGCTTTGGTGTCCAGAGCCT
consensus   61  ..*.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris      97  TGTGCTCACATTTGAACCTTGGTCTT--ACCC-TTGCTTGAAAATTGTGATTTT--
Rat         85  TGACTTGACATTTGAACCTTGGGCTCTG--ACCC-TTGCTTGAATATTGTGATTTT
Humain     117  TGGGGTTGACATTTGAACCTTGGTCTG--ACCCATTCTTGAATATTGTGATTTCT
Mouton     114  CATGTGACATTTTGAACCTTGGTCTCTACCCATGGCTTGAATATGTGTTCCTTG
consensus  121  .....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     152  -----GCCACTTTCGATCTGAATTCTTTGTTAAC--TAAGAAATTTAGT
Rat        142  TTTATTTTCTTTTGCCATTTTACATGCTGAATCTTTGCTAAC--TAAGATAGTTAGG
Humain     175  TT-----TTCTTCCA-----GATGCTGAATGCTTGTTA-CCCTTCAGATTGTTAGG
Mouton     174  TTT-----GTTGTTCTA-----GATGCTGAATTCTGTTAAACCATTCAGAATGTTAGG
consensus  181  ... ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     196  AGTGGTT-TTGTCTG-CTCCTCAGAA--CTTGGCTCTTTGTTGCAACTCAGAAAGTCA
Rat        199  AGTGGTT-TGGTCTG-GCTTCTTAGAA--CTTGGCTCCTTGTGTCACACAGAAAGTTA
Humain     224  AGTGGTTCTGCTTTTG-GTCTGCCAGAATACTGGGTTCTTAGTTGCAACCTAGAATGTCA
Mouton     224  AGTGGTTATCCTTCAGCTTGCAGAACACTGGGTTCTTGGGTGCAACCTAGAATGTCA
consensus  241  ***** ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     252  GATTTCCTGGTTGATTGGAATACAGGCTTAAACCTTTATATTATAGGCTAGGGGTGTTGTT
Rat        255  GATTTCCTGGTTGATTGGAATACAGGCTTAAACCTTTATATCACAGGTCAGGGGTGTTGTT
Humain     283  GATTTCCTGGTTGATTGGAACACAGT-----ATTCTAGG-----TCTGG--
Mouton     284  GATTTCCTGTTGATCCGGAATTTAGGC-----ACTCT--GAAA--TTTGS--
consensus  301  ***** ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     312  GCACGCACCTTAATCCCAGCACCTTGAAGGCAGAGGCAGTTGATCTCTCGGAGTTTGAG
Rat        315  CCAGGCACCTTAATCCCAGCACCTTGAAGGCAGAGGCAGTTGATCTCTCGGAGTTTGAG
Humain     324  -----
Mouton     325  -----
consensus  361  .. ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     372  GCCAGTTTGGCCTATTTAGTGAGTTCAGGCCAGCCATCGATGCATAGTCAGACTCTTTC
Rat        375  GCCAGTTCTGGTTTATSCAGTGAGTTCAGGCCAGCCATGCTGCATAGTTAGACTTTTTC
Humain     324  -----AGGTACTGATG-----
Mouton     325  -----GCTCCTGATG-----
consensus  421  ..... ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     432  TCAAAACAAACAAACAAACAAACAAACAACTTT---TAGAATGTAGAATTCCTTA
Rat        435  TCAAAACAAACAAACAAACAAACAAACAACTTTAGAAATAGAATGTAGAATTCCTTA
Humain     335  --AAATC-----TG-----G-----
Mouton     336  --GAATCA-----TG-----
consensus  481  ...** ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

Souris     488  AAAAAAATAATCCCTTGAAGTTAATGGGGTCTCAATTTCTTCTAGAATTT--GGA
Rat        495  AAAAAT-----TCCCTTGAAGTTAATGGGGTCTCAATTTCTTCTAGAATTT--GGA
Humain     342  -----CTAGAAAGTTAG--GGGGTCTTATTTTCG-----ATT-----
Mouton     343  -----CTGAAAGTCA--GGGGTCTTATTTTCGATCTAGAATTTCTGGGT
consensus  541  ..... ..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*

```


Curriculum Vitae MARYSE DUQUETTE

Information Personnelle

Adresse courante:

1150 Fisher Ave., apt 805
Ottawa, Ontario
K1Z 8M6

Numéro de téléphone:

domicile: (613) 798-9881

travail: (613) 562-5800 ext 5445

courriel: duquetma@yahoo.com

Langues parlées et écrites: français et anglais

Scolarité

1999-2002	M.Sc. en Biochimie , Université d'Ottawa Thèse: Identification d'une Interaction Protéique Spécifique à une Séquence Conservée dans la Région 3' Non-Traduite de l'ARN messager de Prostaglandine Endoperoxide H Synthase-1
1996-1999	B.Sc. en Biochimie , Université de Montréal
1994-1996	D.E.C. en Sciences de la Nature , Cégep Joliette-De Lanaudière

Bourses et distinction

- Récipiendaire d'une bourse du "Keystone Symposia: Eicosanoid Lipid Mediators" (avril 2000)
- Récipiendaire d'une bourse de maîtrise du FCAR (compétition 1999-2000).
- Nominée par l'université de Montréal pour une bourse de recherche du CRSNG (compétition 1999-2000)
- Récipiendaire de la médaille d'excellence du Gouverneur Général du Canada,
- accompagnée d'une bourse (Études Secondaires, 5^{ième} année).

Publications

Résumé:

1. **M. Duquette** et O. Laneuville:

"Specific protein binding to a conserved sequence in the 3'UTR of the prostaglandin endoperoxide H synthase-1 (PGHS-1) mRNA."

Résumé (présentation par affiche et orale) présenté par M. Duquette à la rencontre annuelle du "Keystone symposia: Eicosanoid Lipid Mediators: Biochemistry, Molecular Biology and Pharmacology and Cell-Cell Interactions in Inflammation", Snowbird (USA), 7-12 avril, 2001.

2. **M. Duquette** et O. Laneuville:

"Post-transcriptional regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 gene expression."

Résumé (présentation par affiche) présenté par M. Duquette à la 43^{ième} rencontre annuelle de la Fédération canadienne des sociétés de biologie, Ottawa (Ontario), 22-25 juin, 2000.

3. O. Laneuville, M.H. Plant, C. Mroske and **M. Duquette**:

"Post-transcriptional regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 gene expression in the megakaryocytic cell line MEG-01."

Résumé (présentation par poster) présenté par O. Laneuville à la 11^{ième} rencontre annuelle "International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications", Florence (Italy), 4-8 juin, 2000.

Manuscrit:

1. **M. Duquette** et O. Laneuville:

"Specific protein binding to a conserved sequence in the 3'UTR of the prostaglandin endoperoxide H synthase-1 (PGHS-1) mRNA." Ce papier est en préparation pour être soumis dans *The Journal of Biological Chemistry*, 2002.

Participation aux conférences suivantes:

- "Eicosanoid Lipid Mediators: Biochemistry, Molecular Biology and Pharmacology and Cell-Cell Interactions in Inflammation", Snowbird (USA), 7-12 avril, 2001.
- 43^{ième} rencontre annuelle de la Fédération canadienne des sociétés de biologie, Ottawa (Ontario), 22-25 juin, 2000.
- 18^{ième} rencontre de "International Congress of Biochemistry and Molecular Biology", Birmingham (UK), 16-20 juillet, 2000.

Expériences de travail

- | | |
|------------------------|--|
| Septembre 1999-présent | <p>Étudiante à la maîtrise, Département de biochimie, microbiologie et immunologie, Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario</p> <p>-Examiner le rôle de la régulation post-transcriptionnelle dans l'expression du gène de la prostaglandine endoperoxydase synthase-1 au cours de la différenciation des mégacaryocytes.</p> |
| Automne 1998 | <p>Stagiaire, Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec</p> <p>-Biologie moléculaire des plantes: Séquençage d'un fragment du gène de la protéine p30 impliquée dans la régulation positive du gène de défense <i>Pathogenesis-related 10a</i>.</p> |
| Été 1997 | <p>Stagiaire, Centre de recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec</p> <p>-Biochimie des protéines: Évaluer l'efflux de cholestérol des fibroblastes en fonction de l'agrégation des protéines du plasma sérial bovin (protéines BSP).</p> |

Techniques de recherche

Techniques de biologie moléculaire (eg: ligations, transformations, mini- et maxi-préparation d'ADN plasmidique, PCR, transcription *in vitro*, EMSA avec sonde d'ARN, "UV cross-linking", isolation d'ARN total ou messenger, "slot-blot", transfert et hybridation Northern, distribution d'ARN sur gradient de sucrose, séquençage d'ADN)

Analyse de protéines (eg: préparation d'extraits cellulaires, SDS-PAGE, immunobuvardage Western, chromatographie sur tamis moléculaire (FPLC), dosage protéique)

Activités et loisirs personnelles

Pratique l'aérobic, le ski alpin, le patin, le vélo, la randonnée pédestre
Aime la lecture, les mots croisés et cuisiner

Références

Dr. Odette Laneuville
Professeure agrégée
Université d'Ottawa
Faculté de médecine, Département de biochimie, microbiologie et immunologie
Ottawa, Ontario
Tél.: (613)-562-5800 ext. 8402