

2m11.2966.3

Université de Montréal

Contrôle d'expression de l'ADN primase (PRIM1)

Par

Leila Esmailzadeh

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc)

En biologie moléculaire

Septembre 2001

© Leila Esmailzadeh, 2001



QH

50%

USB

2002

v.014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Contrôle d'expression de l'ADN primase (PRIM1)

Présenté par :

Leila Esmailzadeh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Richard Bertrand, président-rapporteur

Dr Wagner Yotov, directeur de recherche

Dr Abdellah Belmaaza, membre du jury

Mémoire accepté le : 4 Avril 2002

SOMMAIRE

L'ADN primase initie la réplication de l'ADN en synthétisant de courtes amorces d'ARN. La petite sous-unité de l'ADN primase est codée par le gène PRIM1 chez les eucaryotes. Nous avons cartographié le gène PRIM1 humain dans la région 12q13 [43] et identifié une nouvelle protéine de fusion, PRIM-NAC [80], exprimée dans certaines leucémies, qui peut agir comme oncogène. De plus, nous avons trouvé que le gène PRIM1 est amplifié dans 40% des ostéosarcomes chez l'homme [5]. Nous avons cloné et séquencé le promoteur du gène PRIM1. L'expérience de synchronisation des cellules nous montre que l'expression du gène PRIM1 est dépendante du cycle cellulaire [4]. Les objectifs de nos études ont été de déterminer les mécanismes moléculaires de contrôle d'expression du gène PRIM1 et surtout d'étudier la répression d'activité du promoteur PRIM1. Nous avons cloné le promoteur PRIM1 dans un vecteur contenant le gène rapporteur CAT pour étudier son activité. Nous avons démontré qu'un répresseur de transcription, le facteur GCF est un répresseur putatif du promoteur PRIM1 [104]. D'autre part, nous avons identifié que la thrombine et le FVII activé activent indirectement par certaines voies de signalisation non identifiées, le promoteur de gène PRIM1 [48], tandis que l'antithrombine III a un effet opposé. Nous avons construit des mutants de délétion et des mutants ponctuels pour identifier les sites importants pour la transcription du gène PRIM1, ainsi que les sites ciblés par l'antithrombine III et le facteur GCF. Ces résultats nous ont permis d'élaborer certains mécanismes d'activation et de répression du promoteur PRIM1. Certains anticoagulants et le facteur GCF peuvent se présenter comme des choix supplémentaires de traitement du cancer.

Mots clés : ADN primase; Promoteur; Facteur de transcription; Facteur GCF; Antithrombine III; Thrombine; PRIM1; PRIM-NAC; Facteur VII activé.

SUMMARY

DNA primase initiates the DNA replication by synthesizing short RNA primers. The small subunit of DNA primase is encoded by PRIM1 gene in eukaryotes. We mapped the human gene PRIM1 to chromosome 12q13 [43] and found a novel fusion protein, PRIM-NAC [80], expressed in some types of leukemia, which can act as an oncogene. In addition, we have found that the PRIM1 gene is amplified in 40% of human osteosarcoma [5]. We cloned and sequenced the PRIM1 promoter. Cell synchronization experiments have shown that PRIM1 gene expression is cell cycle dependant [4]. The goal of our study was to determine the molecular mechanisms of expression control of PRIM1 gene and particularly to study the repression of PRIM1 promoter activity. We have subcloned the PRIM1 promoter into expression plasmids upstream of the CAT reporter gene. We have demonstrated that a transcriptional repressor, the GCF factor is a putative repressor of the PRIM1 promoter [104]. We have identified that thrombin and activated FVII indirectly activate, through their respective signal transduction pathways, the PRIM1 promoter [48], while antithrombin III has the opposite effect. We have generated series of deletion and point mutation constructs, to identify some sequences important for the PRIM1 transcription, as well as to look for sites responding to antithrombin III and GCF factor. These results helped us to reveal some of the mechanisms of activation and repression of the PRIM1 promoter. Some anticoagulants and the GCF factor may prove useful for cancer treatment.

Keywords : DNA primase; Promoter; Transcription factor; GCF Factor; Antithrombin III; Thrombin; PRIM1; PRIM-NAC; Activated factorVII.

TABLE DES MATIÈRES :

INTRODUCTION.....	1
I) L'ADN PRIMASE	1
I-a) Structure	1
I-b) Fonction.....	3
I-c) Régulation d'expression du gène PRIM1	6
II) L'ADN PRIMASE ET LE CANCER.....	10
III) LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION GCF	13
IV) RÔLE DES PROCOAGULANTS ET DES ANTI- COAGULANTS SUR L'ACTIVITÉ DU PROMOTEUR DU GÈNE PRIM1	15
OBJECTIFS	19
MATÉRIELS ET MÉTHODES	20
I) CONSTRUCTION DES PLASMIDES.....	20
I-a) Construction des mutants de délétion par digestion avec enzyme de restriction	20
I-b) Construction des mutants de délétion par PCR.....	21
I-c) Construction des mutations ponctuelles	22

II) CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION TRANSITOIRE.	24
III) PRÉPARATION D'EXTRAITS NUCLÉAIRES.....	25
IV) EMSA (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>).....	26
V) BASES DE DONNÉES ET LOGICIELS UTILISÉS	27
RÉSULTATS	28
I) ANALYSE STRUCTURELLE DU PROMOTEUR PRIM1.....	28
I-a) Analyse des mutants de délétion	31
I-b) Analyse de mutation ponctuelle dans la boîte TATA	35
II) L'EFFET DU FACTEUR GCF SUR LE PROMOTEUR PRIM1	37
III) RÔLE DES PROCOAGULANT ET ANTICOAGULANT AU NIVEAU DU PROMOTEUR PRIM1	46
III-a) Rôle du FVIIa et de la thrombine	46
III-b) Rôle de l'antithrombine III sur l'activité du promoteur de PRIM1	48
DISCUSSION	51
CONCLUSION.....	58
RÉFÉRENCES	59

LISTE DES FIGURES :

Figure 1. Les quatre sous-unités de l'ADN polymérase α -primase	2
Figure 2. La fourche de réplication et les protéines impliquées dans la réplication.....	4
Figure 3. Représentation schématique du cycle cellulaire	8
Figure 4. Le mécanisme de régulation de la voie pRb	12
Figure 5. La cascade de coagulation	17
Figure 6. Présentation des sites de restriction HindIII, SphI, MluI et SacI dans le promoteur du gène PRIM1	29
Figure 7. Présentation d'une partie des séquences promotrices du gène PRIM1 importantes pour sa transcription, ainsi que présentation des sites de liaison pour les facteurs GCF, Sp1 et E2F-1	30
Figure 8. Activité du promoteur de PRIM1 dans les mutants de délétion p1662, p1663 et p1664	32
Figure 9 (A) et (B). Activité transcriptionnelle des différentes régions du promoteur PRIM1.	34
Figure 10. Présentation des changements de l'activité CAT suite à l'introduction d'une mutation ponctuelle (p1673) dans la boîte TATA putative par rapport à l'activité du promoteur PRIM1 sauvage (p1361).	36
Figure 11. Présentation des deux sites de liaisons du facteur GCF.....	37

- Figure 12 (A).** L'effet de facteur GCF reconstruit (p1405) sur le promoteur PRIM1, ainsi que le promoteur PRIM1 muté (le clone p1672)39
- Figure 12 (B).** L'effet du facteur GCF reconstruit (p1405) sur le promoteur minimal du gène PRIM1 (p1965), ainsi que sur le promoteur minimal PRIM1 ayant des mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du GCF (les clones p1968 et p1969).....40
- Figure 13 (A).** Vérification de la liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison du facteur GCF, utilisant différentes concentrations d'extrait nucléaire.43
- Figure 13 (B).** Vérification de la liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison du facteur GCF en présence de différentes concentrations de compétiteur.....44
- Figure 13 (C).** Vérification de la liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison sauvages et mutés du facteur GCF. 45
- Figure 14.** L'effet de la thrombine (0,1 U/ml) et de FVIIa (100 nM) sur le promoteur PRIM1..47
- Figure 15 (A) et (B).** Résultats préliminaires d'identification des séquences du promoteur PRIM1 qui répondent à l'antithrombine III.....49

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS :

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARN m : ARN messenger

CAT : *chloramphenicol acetyl transferase*

CDK : *cyclin dependent kinase*

CTP : *cytosin triphosphate*

D : aspartate

ddNTP : *didesoxynucleosid triphosphate*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

EMSA : *electrophoretic mobility shift assay*

FVII : *factor VII*

G1, G2 : *gap 1, gap 2*

GCF : *GC factor*

GFP : *green fluorescence protein*

h : *hour*

IGF-I : *insulin-like growth factor-I*

INK4 : *inhibitor of CDK4*

kb : *kilobase*

kDa : *kilodalton*

MDM2 : *murine double minute 2*

NAC : *nascent polypeptide-associated complex*

NK : *natural killer*

NTP : *nucleotide triphosphate*

PAR : *protease activated receptor*

Pb : *paire de base*

PBS : *phosphate-buffered saline*

PCNA : *proliferator cell nuclear antigen*

PCR : *polymerase chain reaction*

pRb : *protéine de rétinoblastome*

PRIM1 : *Primase subunit 1*

R : *restriction point*

SSB : *single strand DNA binding protein*

TAF : *TBP-associated factors*

TBP : *TATA-binding protein*

TF : *tissue factor*

TGF α : *tumor growth factor alpha*

TFPI : *tissue factor pathway inhibitor*

U : *unit*

REMERCIEMENT

Je voudrais remercier mes parents, ma mère Ferechteh et mon père Jamshide, qui m'ont entouré et soutenu durant ces deux dernières années. De plus, j'aimerais exprimer ma sincère gratitude et mon infinie reconnaissance au docteur Wagner Yotov, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir ainsi donné l'occasion unique de découvrir le monde merveilleux de la biologie moléculaire. Merci aussi pour sa patience à toute épreuve, sa grande disponibilité et l'aide précieuse qu'il m'a apportée tout au long de cette maîtrise. Un grand merci aussi à mes collègues du laboratoire, Sylvie Cloutier, Sarah Falconi et Juan Carlos Feoli, avec qui j'ai passé des moments agréables.

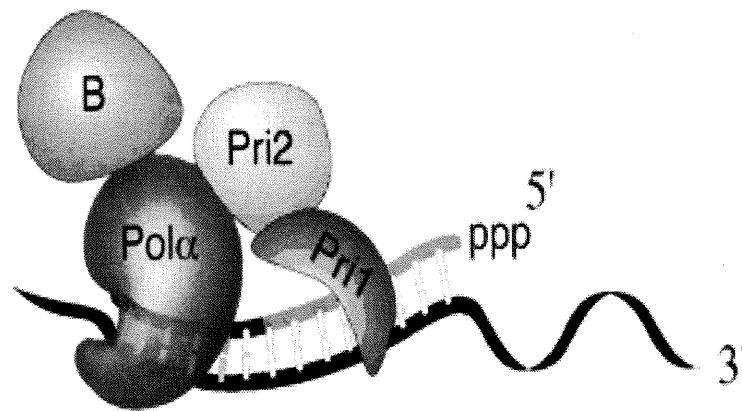
INTRODUCTION

I) L'ADN PRIMASE

L'ADN primase est l'enzyme qui initie la synthèse de nouveaux brins d'ADN en synthétisant des courtes amorces d'ARN en présence d'une matrice simple brin d'ADN.

I-a) Structure

Les gènes qui codent les sous-unités de l'ADN polymérase α -primase ont été identifiés, clonés et exprimés chez l'homme, la souris, le rat, la drosophile, *Drosophila melanogaster* et les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* [45, 58, 68]. L'ADN primase est constituée de deux sous-unités chez les eucaryotes. Elle a une petite sous-unité d'environ 49 kDa et une grande sous-unité de 58 kDa. Les deux sous-unités de la primase forment un complexe avec les deux sous-unités de l'ADN polymérase α (voir figure 1). Cette dernière a une grande sous-unité de 180 kDa et une petite sous-unité de 70 kDa [33]. La sous-unité p180 est responsable de l'activité de l'ADN polymérase et elle est phosphorylée en fonction des phases du cycle cellulaire. La sous-unité p180 se lie à la sous-unité p70 (B) qui est elle aussi phosphorylée dépendamment des phases du cycle cellulaire [30, 31, 32]. Par ailleurs, la sous-unité p180 se lie également aux deux sous-unités de l'ADN primase, la p49 et la p58. La p49 est la sous-unité catalytique de l'ADN primase. La sous-unité p58 contient un signal de localisation cellulaire lui permettant de diriger le complexe p49-p58 au noyau [36, 34]. La p58 sert également de pont entre la sous-unité p180 de l'ADN polymérase α et la sous-unité p49 de l'ADN primase [35, 37]. Des études effectuées sur la primase démontrent que l'action de la sous-unité p49 dépend étroitement de la présence de la sous-unité p58 pour initier la synthèse d'amorce. L'association des deux sous-unités est très importante pour la stabilité enzymatique de la primase [38, 39, 35].



Source : Frick ND, and Richardson CC. Annu Rev Biochem, 70 : 39-80, 2001 [78].

Figure 1. Les quatre sous-unités de l'ADN polymérase α -primase. L'ADN polymérase α et sa sous-unité B forment un complexe avec les deux sous-unités de l'ADN primase. La grande sous-unité de l'ADN primase est codée par le gène PRIM2 (Pri2) alors que sa petite sous-unité est codée par le gène PRIM1 (Pri1).

La primase eucaryotique est un membre de la famille des x nucléotidyl-transférases incluant les enzymes diverses comme l'ADN polymérase β , la transférase terminale et plusieurs nucléotidyl transférases [41]. Les aspartates D109, D111 et D306 de la sous-unité p49 sont importante pour son activité [42].

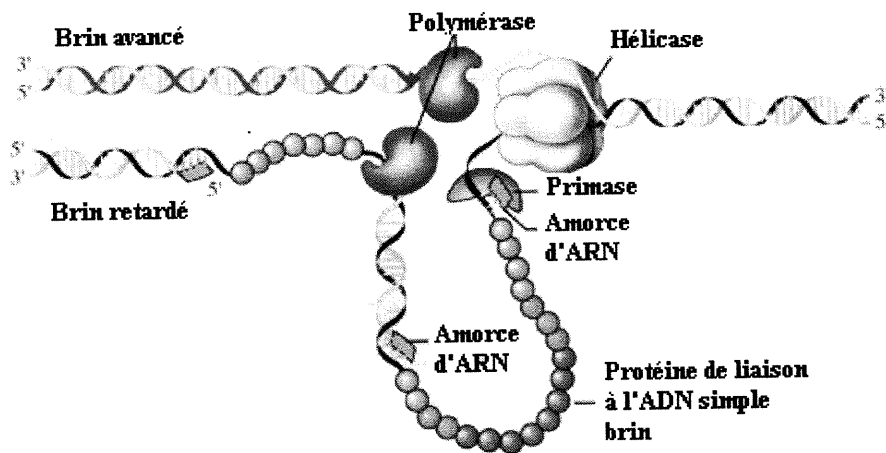
Chez l'homme, nous avons cartographié la petite sous-unité de la primase (p49) sur le bras long du chromosome 12. Elle est codée par le gène PRIM1. La grande sous-unité de la primase (p58) a été cartographiée sur le chromosome 6 à deux loci. Cette dernière est le produit du gène PRIM2 [43, 44].

Plusieurs études ont été effectuées sur la structure protéique de l'ADN primase. Cependant, les structures promotrices des gènes codant les sous-unités de la primase ne sont pas connues. Par exemple, la séquence du promoteur du gène PRIM1 n'est pas publiée et les activateurs et les répresseurs de la transcription de ce gène ne sont pas connus.

I-b) Fonction

Une des étapes fondamentales dans la réplication d'ADN est la synthèse de courtes amorces d'ARN par l'ADN primase.

La duplication fidèle de l'information génétique résulte de la réplication d'ADN [60]. Selon le modèle proposé par Watson et Crick en 1953, pendant la réplication, le double brin d'ADN s'ouvre et chaque brin parental d'ADN sert de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire [59]. Donc, la réplication du duplex d'ADN à chaque fourche est semi-conservatrice : chaque duplex fils consiste en un brin parental et son complémentaire nouvellement formé. Le mécanisme de réplication implique la collaboration de plusieurs protéines (voir figure 2).



Source : Frick ND, and Richardson CC. Annu Rev Biochem, 70 : 39-80, 2001 [78].

Figure 2. La fourche de réplication et les protéines impliquées dans la réplication. La fourche de réplication progresse de gauche à droite. L'ADN bicaténaire est une hélice à brin antiparallèle. Le brin avancé s'allonge continuellement. Le brin retardé s'allonge de façon discontinue. Les ADN hélicases glissent sur le duplex d'ADN et en séparent les brins. La réassociation des brins détordus est contrecarrée par les protéines de liaison à l'ADN simple brin. L'ADN primase initie la synthèse du brin retardé en synthétisant des courtes amorces d'ARN. Ces amorces vont être ensuite transférées à l'ADN polymérase.

L'ADN hélicoïdal est un duplex de brins antiparallèles : un brin dans le sens 5' → 3', l'autre dans le sens 3' → 5'. Le modèle de la réplication semi-discontinue a été proposé pour expliquer la croissance unidirectionnelle des deux brins d'ADN, étant donné que l'ADN polymérase opère dans une seule direction (5' → 3') en ajoutant des nucléotides à l'extrémité 3' de la chaîne naissante. Donc, un des brins que l'on appelle le brin avancé est continuellement synthétisé, alors que l'autre brin, le brin retardé, est synthétisé en petits fragments, les fragments d'Okazaki.

La réplication d'ADN commence par l'élimination de la structure super-enroulée de l'ADN à l'aide des topoisomérases et des ADN gyrases. Ensuite, les ADN hélicases ouvrent la double hélice en éliminant des ponts hydrogène qui unissent les bases complémentaires. Dès l'ouverture des deux brins, les SSB (*single strand DNA binding proteins*) se lient à l'ADN simple brin pour empêcher le réappariement des brins complémentaires. La prochaine étape est la synthèse de nouveaux brins d'ADN par les ADN polymérases [77]. Parmi les ADN polymérases, aucune ne peut amorcer une chaîne *de novo* [64]. Elles ont besoin de l'extrémité 3' d'une amorce préexistante pour synthétiser les nouveaux brins en allongeant ces amorces. L'ADN primase est l'enzyme responsable qui synthétise ces courtes amorces d'ARN mentionnées. L'ADN primase catalyse la synthèse des oligoribonucléotides en cinq étapes : liaison à l'ADN simple brin, liaison aux NTPs, initiation de la synthèse d'amorce, extension de l'amorce jusqu'à environ 10 nucléotides, transfert de l'amorce à l'ADN polymérase [78]. Les primases eucaryotiques préfèrent la présence des pyrimidines dans la matrice ADN simple brin et lient les matrices riches en pyrimidine plus efficacement que les matrices riches en purine [73, 74].

L'ADN primase commence la synthèse du brin avancé par la synthèse de courtes amorces d'ARN qui ont habituellement une longueur de 8 à 12 nucléotides [40, 69, 70]. Ces amorces fournissent un groupement 3'-hydroxyl [65, 75, 79] afin de permettre leur élongation par l'ADN polymérase δ [66, 67]. L'élongation du brin avancé se fait de façon continue. La synthèse du brin retardé débute également par la

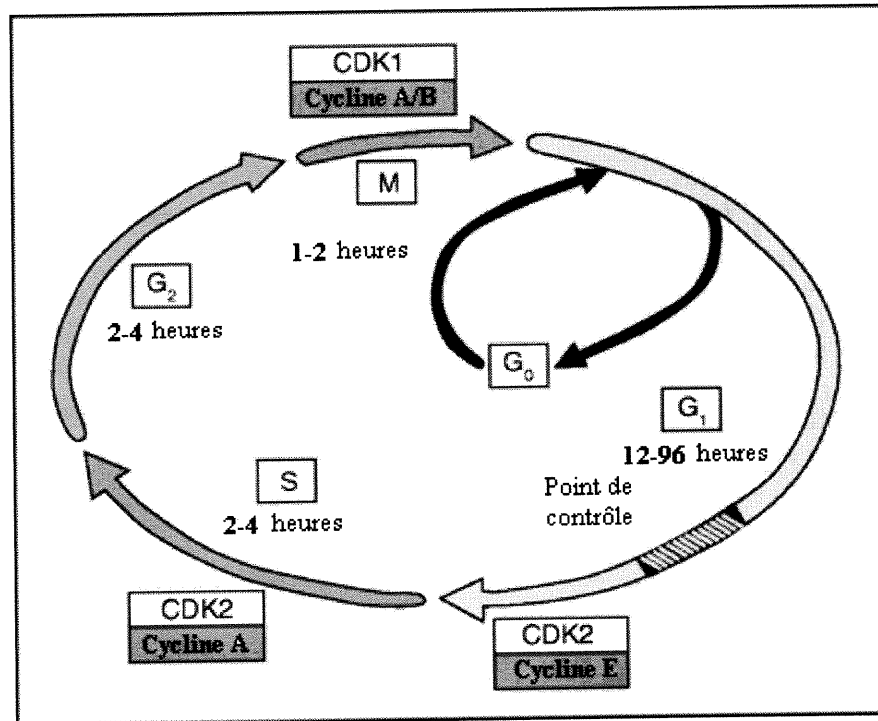
synthèse de courtes amorces d'ARN par la primase et est suivie par l'élongation de cette amorce par l'ADN polymérase α [62, 63]. Le résultat de cette élongation est la synthèse des fragments d'Okazaki [71]. Chaque fragment d'Okazaki doit se lier au fragment précédent pour que la polymérisation du brin retardé soit complétée [61]. Pour cela, l'amorce d'ARN doit être éliminée par les enzymes Rnase H et l'exonucléase 5'→ 3' [72]. L'espace produit doit être rempli par les ADN polymérases δ et ϵ et les fragments d'Okazaki doivent être liés par la ligase [60, 72].

Les rapports publiés aident à comprendre les étapes de la réplication d'ADN et le rôle important de l'ADN primase (PRIM1) dans la réplication. Cependant, la fonction de l'ADN primase est directement liée à son profil d'expression au cours du cycle cellulaire. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation d'expression de PRIM1, ainsi que les mécanismes de contrôle de son expression sont inconnus.

I-c) Régulation de l'expression du gène PRIM1

L'ADN primase est essentielle pour la réplication d'ADN, car l'ADN polymérase n'est pas capable d'initier la réplication par elle-même. Par conséquent, le produit du gène PRIM1 est un facteur essentiel à la progression de la phase G1 à S du cycle cellulaire. Des études effectuées sur l'expression des quatre sous-unités de l'ADN polymérase α -primase chez la souris démontrent que l'expression des quatre sous-unités est induite par l'activation de la prolifération cellulaire. Ces études ont aussi démontré que l'expression génique des deux sous-unités de l'ADN primase commence avec le début de la phase répliative du cycle cellulaire, elle augmente de 5 à 6 fois pendant la phase S et diminue au niveau basal après la phase S du cycle cellulaire [4, 19, 27]. Chez la levure, le niveau de l'ARNm de l'ADN polymérase- α , ainsi que des deux sous-unités de l'ADN primase, atteint son maximum dans les phases G1/S du cycle cellulaire [21, 22, 23]. Ainsi, il a été montré que la capacité de l'ADN polymérase α -primase à initier la réplication de l'ADN est à son maximum

lors de la phase G1-S, diminue à la fin de la phase S et atteint son minimum dans les phases G2 et M [4] (voir figure 3 pour les différentes étapes du cycle cellulaire).



Source : Israels ED, and Israels LG. Stem Cells, 19 : 88-91, 2001 [6].

Figure 3. Représentation schématique du cycle cellulaire (le temps marqué n'est qu'un exemple). Les quatre phases du cycle cellulaire sont : G₁, S, G₂, et M. La phase G₁ est la pause entre la mitose (M) et la phase de synthèse d'ADN (S). La progression au début de phase G₁ est dépendante de facteurs de croissance, mais après un certain temps suite à la mitose, les cellules avancent et effectuent un cycle complet même en absence de facteur de croissance. La phase G₂ est la pause entre la phase S (la phase dans laquelle les chromosomes se répliquent) et la phase M. La phase M est la mitose. Chaque phase ne peut commencer que si la précédente est totalement terminée. Le complexe cycline E/CDK2 est nécessaire pour le passage de phase G₁ à la phase S. Par la suite, le complexe cycline A/CDK2 se forme et la synthèse d'ADN commence. Le taux des cyclines mitotiques (cycline A et cycline B) augmente au cours des phases S et G₂. Plus tard, les cyclines A et B s'associent avec le CDK1 pour déclencher la mitose.

Il existe plusieurs explications potentielles pour les variations de l'activité de l'ADN primase observées durant le cycle cellulaire. Un des mécanismes possibles pour la régulation d'activité de l'ADN polymérase α -primase est la modification posttraductionnelle. L'ADN polymérase α est phosphorylée dépendamment du cycle cellulaire. Deux kinases ont été identifiées pour effectuer la phosphorylation : La cycline E/CDK2 qui régule la transition de G1 vers la phase S et la cycline A/CDK2 qui agit dès la fin de la phase G1 [24, 25]. Chez la levure, la souris et l'homme, la phosphorylation de l'ADN polymérase α -primase par la cycline A/CDK2 cause l'inhibition de l'activité du complexe ADN polymérase α -primase, alors que le cycline E/CDK2 stimule l'activité du complexe ADN polymérase α [4, 24, 25]. La régulation d'expression de l'ADN polymérase α -primase durant le cycle cellulaire peut aussi expliquer les variations de l'activité de l'ADN polymérase α -primase durant ce cycle. Deux autres mécanismes pour expliquer les variations d'activité de l'ADN polymérase α -primase durant le cycle cellulaire sont les régulations transcriptionnelles (l'activation/répression de son gène) et posttranscriptionnelles (la dégradation rapide de l'ARN m) [4]. Nos études portent sur les mécanismes de régulation d'expression du gène PRIM1 au niveau du promoteur du gène, c'est à dire sur les régulations transcriptionnelles.

La régulation de transcription des deux sous-unités de l'ADN primase de la souris (le p46 et le p54) a été étudiée [82]. Il a été démontré que le promoteur du gène de la petite sous-unité p46 de l'ADN primase de la souris est dépourvu de la boîte TATA. Les facteurs impliqués dans la régulation de la transcription basale ne sont pas connus. Cependant, des sites de liaison à E2F proche du site d'initiation de la transcription ont été démontrés expérimentalement [82]. Le facteur E2F est un facteur de transcription qui active la transcription de certains gènes requis pour le passage à travers le point R (par exemple, les gènes codant pour la thymidine kinase ou pour les cyclines A ou E) ou des gènes impliqués dans la réplication d'ADN (gène codant pour l'ADN polymérase α ou PCNA) [13, 14, 15, 16]. Ce facteur de transcription est essentiel pour la transcription des gènes p46 et p54 suite à une stimulation de croissance cellulaire [82]. Cependant, rien n'est connu sur le contrôle d'expression du

gène PRIM1 humain. À cet égard, nous avons cloné et séquencé le promoteur du gène PRIM1. L'homologie entre les séquences du promoteur du gène codant la sous-unité p46 de la souris et celles du promoteur du gène codant la sous-unité p49 de l'homme est de 40% [80]. La recherche TESS nous a révélé des sites de liaison pour le facteur E2F dans les séquences promotrices du gène PRIM1. Ce facteur pourrait être important dans la régulation de l'expression du gène PRIM1.

II) L'ADN PRIMASE ET LE CANCER

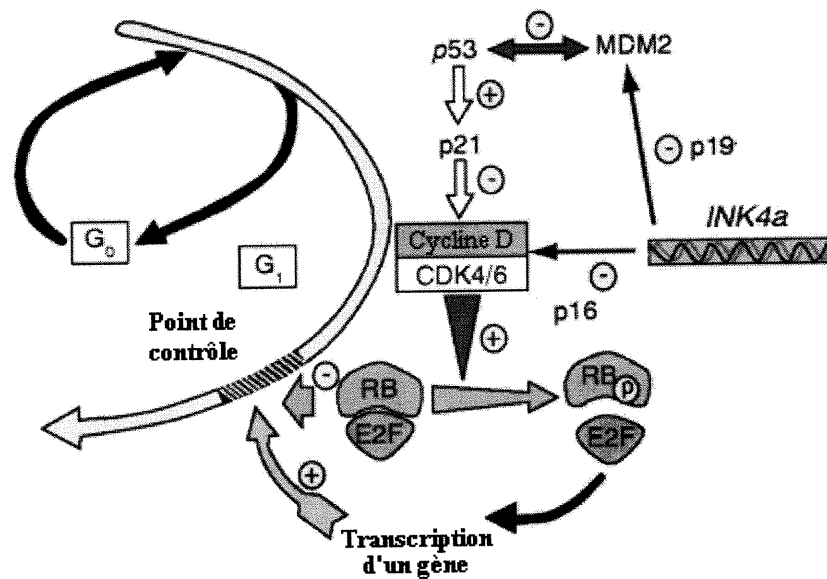
Un système dépourvu d'ADN primase, serait dans l'incapacité d'initier la réplication. L'étude des mécanismes de contrôle de l'expression du gène PRIM1, le gène qui code la sous-unité catalytique de la primase, est utile pour la recherche de nouvelles thérapies pour certaines maladies reliées à une augmentation de la prolifération cellulaire tel que le cancer.

Certaines études ont démontré une augmentation d'expression significative (10 à 40 fois) de l'ARN messager de la polymérase α -primase, ainsi qu'une augmentation de son activité enzymatique dans les cellules humaines transformées [28, 31]. L'amplification d'expression génique de l'ADN polymérase α , se produit aux niveaux transcriptionnel et posttranscriptionnel suivant la transformation cellulaire [3]. Quant à l'ADN primase, nous avons démontré que son gène, le PRIM1, est amplifié dans les ostéosarcomes [5].

L'expression de l'ARN messager de PRIM1 est régulée durant le cycle cellulaire par l'activation /répression de sa transcription et une dégradation rapide de son ARNm [4]. Une dérégulation du gène encodant la sous-unité catalytique de l'ADN primase (PRIM1) peut mener à une perte de contrôle de la synthèse d'ADN en phase S. À ce moment, l'ADN primase pourrait devenir un facteur majeur dans la progression néoplasique. Chez les eucaryotes, il existe des mécanismes spécifiques de régulation, ainsi que des points de restriction (R) durant le cycle cellulaire [1, 2]. Le point R est un moment dans la phase G1 après lequel les cellules peuvent proliférer

indépendamment des stimulus extérieurs [9,10]. Les cellules tumorales ne sont plus sujettes aux mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire et continuent de se proliférer, même en absence de stimulus extracellulaire. Le phénomène d'inhibition de contact est perdu chez les cellules tumorales. Le résultat de cette perte de contrôle du cycle cellulaire est une dérégulation d'expression des gènes dont l'expression est dépendante du cycle cellulaire. Une cible obligatoire des étapes de l'oncogénèse dans presque tous les cancers, est la voie pRb. L'interaction entre p16, cycline D/CDK et pRb/E2F constitue une unité fonctionnelle qu'on appelle la voie pRb [17, 18] (voir la figure 4 pour la voie pRb et sa régulation). Chacune des composantes de la voie Rb peut être dérégulé dans un processus cancéreux. Un exemple est le facteur E2F qui sous sa forme libre peut activer la transcription des gènes impliqués dans la réplication (par exemple ADN polymérase α -primase) [13, 14, 15, 16].

L'expression génique des deux sous-unités de l'ADN primase, p49 et p58, diminue dans les cellules différenciées. Cette diminution d'expression est causée en parti par une réduction de l'initiation de la transcription [26]. Par contre, l'expression génique du complexe l'ADN polymérase α -primase est élevée dans les cellules transformées qui ne se différencient pas et continuent de se proliférer, même en absence des facteurs de croissance ou même au cas de contact cellulaire [20]. Donc, la surexpression du gène PRIM1 pourrait être la conséquence de la transformation cellulaire.



Source : Israels ED, and Israels LG. Stem Cells, 19 : 88-91, 2001 [6].

Figure 4. Le mécanisme de régulation de la voie pRb. Le cycle cellulaire commence à G₁ avec une augmentation d'expression des cyclines D (D1, D2, D3). Les cyclines D s'associent avec les CDK4 et CDK6 et le résultat de cette association est l'activation des CDKs. Ces dernières à leur tour phosphorylent la protéine du rétinoblastome. La pRb est la gardienne de la porte du point R. Cette protéine, sous sa forme déphosphorylée exerce une action antiproliférative, puisqu'elle est en complexe avec les facteurs de transcription de la famille E2F et empêche ces facteurs d'activer les gènes nécessaires à la réplication d'ADN. Les CDKs 4/6 phosphorylent la pRb et ainsi permettent la dissociation du complexe et la libération des E2Fs. Ces derniers vont ensuite activer la transcription de certains gènes requis pour le passage à travers le point R. La famille INK4, constituée des protéines p16, p15 et p19, inhibent spécifiquement les CDK4/6. La protéine p19 participe à la dégradation de la protéine mdm2, cette protéine ayant pour fonction de bloquer l'activité transactivatrice de p53. Une accumulation de p53 induit l'expression de p21. La p21 se lie à tous les complexes cycline/CDK et inhibe la phosphorylation de pRb. Donc, la cellule reste en G₁.

La protéine codée par le gène PRIM1 n'est pas impliquée dans l'oncogenèse. Cependant, nos études sur la protéine de fusion PRIM-NAC démontrent que la primase dans ce contexte peut agir comme un oncogène. La protéine de fusion PRIM-NAC contient les séquences protéiques de l'ADN primase1 (PRIM1) et celles de l' α -NAC qui est un facteur de transcription. Cette protéine est détectée dans certaines leucémies. Elle cause la transformation *in vitro* des cellules NIH3T3 et induit des tumeurs chez la souris [80].

III) LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION GCF

Les résultats obtenus par la recherche en ligne TESS avec la séquence promotrice du gène PRIM1 nous montrent la présence de deux sites de liaison (position 17 à -11 et -6 à +4) pour un répresseur de la transcription, le facteur GCF. Le facteur de transcription GCF, composée de 784 acides aminés, est codé par un ARN messenger de trois kb. Cette protéine réprime la transcription des gènes qui sont riche en séquence GC comme les séquences promotrices du gène EGFR codant pour le récepteur d'un facteur de croissance épidermique et les séquences promotrices du gène de la β -actin. Des sites de liaison au facteur GCF ont été identifiés dans les promoteurs d'autres facteurs de croissance ainsi que leurs récepteurs, des oncogènes et des gènes qui contrôlent la croissance cellulaire [85-92 et 104]. En plus, il a été démontré que le GCF réprime l'activité du promoteur du gène TGF- α ainsi que le promoteur du gène codant pour le récepteur d'IGF-I [93, 84].

Le développement des anticorps contre la protéine GCF, exprimée chez les bactéries, a permis de mieux caractériser la protéine GCF au niveau cellulaire. Le GCF est un facteur de transcription exprimé dans toutes les cellules à faible concentration [93]. C'est une protéine stable avec une longue demi-vie. En plus, elle est nucléaire et également une phosphoprotéine [95].

Un caractère particulier de la protéine GCF est que son extrémité N-terminal est extrêmement basique. Des acides aminés basiques constituent 40% de ses 78

premiers résidus [94]. Des études de délétions dans différentes régions de cette protéine avaient démontré que la région basique était responsable de la liaison de cette protéine à l'ADN [83]. Mais l'extrémité N-terminal est trop basique pour que la liaison du facteur de transcription GCF à l'ADN se fasse de façon spécifique. Une révision des séquences de l'ADNc a été effectuée et révéla que le GCF auparavant publié encode pour une protéine chimérique, le produit d'un artefact de clonage [94]. Les premiers 293 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ADNc du GCF viennent d'une autre protéine appelée LRRFIP1. Les nucléotides allant de 294 jusqu'au 308 existent seulement dans la protéine chimérique (artefact de clonage). En plus, l'analyse 5'-RACE (*5'-rapid amplification of cDNA end*) a révélé que la séquence à l'extrémité 5' du facteur GCF révisé est différente de celle de la protéine chimérique trouvée après la position 308. Une nouvelle séquence de 31 nucléotides a été identifiée à l'extrémité 5' du facteur GCF révisé. De plus, une nouvelle séquence de 114 nucléotides a été trouvée entre les nucléotides 851 à 852 du facteur GCF publié. Mais, cette séquence peut être épissée comme étant un intron.

Le facteur GCF révisé, est codé par 2661 nucléotides. Il est composé de 781 acides aminés dont la partie basique a été remplacée par une nouvelle séquence de 147 acides aminés. La fonction de cette protéine révisée n'est pas connue.

Nous avons utilisé le gène codant pour le facteur GCF chimérique pour reconstruire le facteur GCF révisé, en enlevant les séquences codant pour le facteur LRRFIP1. Par la suite, nous avons étudié son effet au niveau du promoteur du gène PRIM1.

IV) RÔLE DES PROCOAGULANTS ET ANTICOAGULANTS SUR L'ACTIVITÉ DU PROMOTEUR DU GÈNE PRIM1

Une autre partie de notre travail porte sur l'étude du rôle des facteurs de coagulation à activité mitogène tels le FVIIa et la thrombine ainsi qu'un anticoagulant, l'antithrombine III, au niveau du promoteur du gène PRIM1.

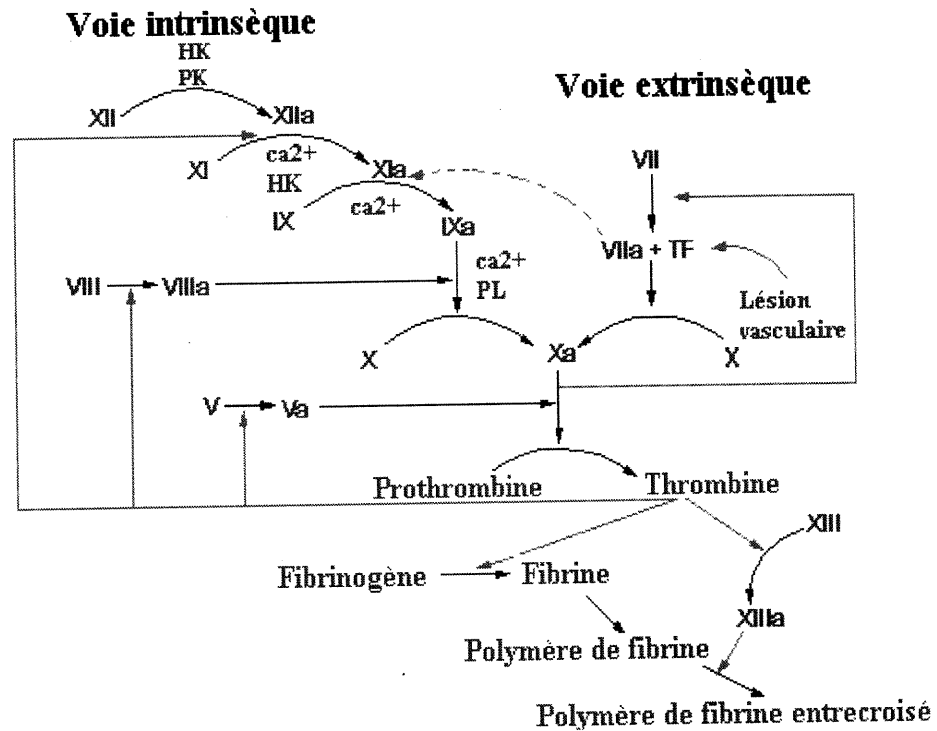
Quelques composantes de la coagulation sanguine comme le facteur FVIIa, le facteur Xa et la thrombine peuvent stimuler la croissance tumorale, ainsi que le développement des métastases [106].

Le facteur VIIa se lie à son récepteur cellulaire, le facteur tissulaire. Le facteur tissulaire est un procoagulant très bien caractérisé [29, 122]. Le complexe FVIIa/TF est l'initiateur de la cascade de coagulation [102] (voir figure 5). Le facteur tissulaire est exprimé au niveau de plusieurs tumeurs [123]. Il existe une corrélation entre une surexpression du facteur tissulaire et la métastase des lignées cellulaires tumorales [124-127]. Une augmentation du nombre des métastases a été observée chez des lignées cellulaires du mélanome humain suite à une transfection par l'ADNc qui encode le facteur tissulaire humain [126]. Le facteur tissulaire favorise la croissance tumorale par l'initiation de la coagulation et par la réorganisation du cytosquelette tumorale, pour faciliter la migration et l'attachement des cellules tumorales. Un autre facteur qui joue un rôle au niveau de la biologie tumorale et le développement de métastases est le FXa. Il est impliqué dans la croissance tumorale via la production de la thrombine [129] (voir figure 5 pour la cascade de coagulation). Les études d'immunohistochimies effectuées, par Zacharski et al [130], ont mis en évidence la présence de FXa à la surface des cellules d'un carcinome pulmonaire, d'un carcinome rénal, ainsi que les cellules du mélanome.

L'effet métastatique de la thrombine (une protéine de la cascade de coagulation) a aussi été démontré. Chez la souris, le traitement des cellules du mélanome et du carcinome du colon par la thrombine augmente le nombre des

métastases, ainsi que le volume tumoral [131 et 116]. La thrombine induit l'activité mitogène et cause une augmentation de volume au niveau tumoral. L'ajout de la thrombine aux cellules endothéliales de veines ombilicales humaine en culture, augmente la synthèse d'ADN d'environ quatre fois [119]. L'activité mitogène de la thrombine chez les lignées cellulaires du mélanome a été aussi démontrée [120].

L'effet métastatique de la thrombine peut être expliqué par la formation des polymères de fibrine et les effets intracellulaires (mitogènes) produits via les récepteurs de la thrombine (PAR 1, PAR 3 et PAR 4) [76, 110, 111, 112, 113 et 115]. L'activation des PARs au niveau des cellules tumorales, par la thrombine, pourrait stimuler la prolifération cellulaire, ainsi que l'adhésion des cellules aux molécules de la matrice extracellulaire et l'endothélium vasculaire [106].



source: Bromberg MB, and Cappello M. Cancer J Sci Am, 5 : 132-138, 1999 [106].

Figure 5. La cascade de coagulation. Une lésion au niveau des vaisseaux sanguins, mène à l'exposition des facteurs tissulaires au facteur de coagulations FVIIa. Le complexe TF/FVIIa active les facteurs X et IX. Un complexe constitué de facteur Xa, facteur Va et le calcium, effectue le clivage de la prothrombine en thrombine. Le facteur V est activé par le Facteur Xa et la thrombine. La propagation de la cascade de coagulation se fait par la thrombine qui active la voie intrinsèque. La thrombine active les facteurs V, VIII et XI. Le facteur VIII circule en étant lié au facteur von Willebrand. Lorsque le facteur VIII est activé, il se sépare de facteur von Willebrand, une protéine adhésive importante pour la génération du caillot plaquettaire initial, et forme un complexe avec le facteur IXa qui active le facteur X. L'activation du facteur XI par la thrombine se fait par une autre boucle d'amplification qui mène à la production de facteur IXa. Cette dernière forme un complexe avec les facteurs X, VIII activé et le calcium assemblé à la surface cellulaire pour générer le facteur Xa. La thrombine finalement convertit le fibrinogène en un monomère de fibrine. Enfin, la fibrine va être polymérisée.

L'antithrombine III, à cause de son pouvoir d'antagoniser les facteurs impliqués dans la métastase et la croissance cellulaire (la thrombine et le FVIIa) peut agir comme un agent antimétastatique et antitumoral [108 et 109].

Il a été observé que la stimulation de la coagulation suivant une chirurgie, est liée à une augmentation significative des métastases et qu'elle est supprimée par les anticoagulants [121]. À cet égard, certaines études portant sur des métastases expérimentales chez la souris ont révélé que les inhibiteurs de la thrombine peuvent empêcher le développement des métastases [102, 103, 114, 118, 116, 117, 120-131].

Donc les anticoagulants inhibent la progression des tumeurs en inhibant la croissance tumorale et en empêchant les métastases. Cependant, les mécanismes par lesquels ces anticoagulants agissent pour produire ces effets ne sont pas connus. Basé sur le fait que la thrombine et les autres procoagulants en tant qu'agents mitogènes augmentant l'expression de PRIM1 [48], notre hypothèse de travail était que les anticoagulants peuvent, par contre, diminuer l'expression du gène PRIM1, ce qui mène à une diminution de la réplication d'ADN et la prolifération cellulaire. Ainsi, une partie de notre travail portait sur la vérification de l'effet d'un anticoagulant, l'antithrombine III, sur l'activité du promoteur du gène PRIM1.

OBJECTIFS

Rien n'est connu sur les mécanismes de contrôle d'expression du gène PRIM1 au niveau de son promoteur, qui doivent expliquer la différence entre les niveaux de l'ARNm pour PRIM1 pendant les différentes étapes du cycle cellulaire. Nos études ciblent à élucider ces mécanismes. L'objectif de notre étude est d'identifier des sites importants du promoteur PRIM1 pour l'activation et la répression de l'expression du gène PRIM1. L'étude des mécanismes de contrôle négatif d'expression du gène PRIM1 est un outil très intéressant pour le développement de meilleurs traitements des cancers où le gène PRIM1 est amplifié ou surexprimé. Puisque la répression de l'activité du promoteur du gène PRIM1 pourrait mener à l'arrêt de la réplication de l'ADN et de la prolifération cellulaire incontrôlée, l'identification des facteurs nouveaux ou connus qui inhibent l'expression du gène PRIM1 nous a paru un aspect intéressant. Ces facteurs peuvent servir comme des agents thérapeutiques anticancéreux. À cet égard, nous avons cloné et séquencé le promoteur du gène PRIM1 afin d'étudier les mécanismes de la régulation de son expression et surtout les mécanismes de sa répression. Notre projet cible certains facteurs qui inhibent l'expression du gène PRIM1 au niveau de la transcription, soit par un effet direct (facteur de transcription, répresseur de transcription), soit par un effet indirect (voies de signalisation) qui mènent à la répression du promoteur PRIM1. La recherche en ligne par le logiciel TESS nous a proposé un répresseur de transcription, le facteur GCF, ayant des sites de liaison au niveau du promoteur du gène PRIM1. Donc, un de nos objectifs consistait à voir l'effet du facteur GCF sur le promoteur du gène PRIM1. De plus, nous avons voulu vérifier l'effet de l'antithrombine III, étant un anticoagulant à activité antimitogène, afin d'élucider certains mécanismes d'inhibition d'expression du gène PRIM1 qui pourraient nous aider à développer des nouvelles stratégies pour le traitement des cancers. Un autre objectif de notre travail était d'étudier l'effet de certains facteurs à activité mitogène (FVIIa et la thrombine) sur le promoteur du gène PRIM1. La thrombine et le FVIIa, ayant la capacité d'activer l'expression du gène PRIM1, pourraient être utilisés dans le cas où une prolifération cellulaire serait requise.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I) CONSTRUCTION DES PLASMIDES

Le gène humain PRIM1 a été isolé en criblant une librairie d'ADN génomique construite dans le vecteur phage lambda [43]. Des séquences du promoteur PRIM1 ont été sous-clonées dans un plasmide d'expression en amont du gène rapporteur CAT. Le clone PRIM-CAT a été obtenu en insérant le promoteur du gène PRIM1, un fragment HindIII-SacI de ~1.8 kb (-1733/ +47), dans le vecteur E1b-CAT (voir la figure 6). Nous avons utilisé le plasmide PRIM-CAT (p1361) pour la génération des mutants de délétion ou mutants ponctuels.

I-a) Construction des mutants de délétion par digestion avec enzyme de restriction

Pour le mutant de délétion, p1662 (Δ -1733/ -1085), le plasmide PRIM-CAT a été digéré avec les enzymes HindIII et SphI. Pour la construction du mutant de délétion, le p1663 (Δ -1085/ -152), le plasmide PRIM-CAT a été digéré avec les enzymes SphI et MluI. Les enzymes utilisées pour la construction du mutant de délétion p1664 étaient le MluI et SacI. Ensuite, les extrémités cohésives ont été remplies utilisant le T4 DNA polymérase. Les bouts pleins ont été joints par la ligation. Les clones ont été analysés par digestion. L'enzyme utilisée pour l'analyse des clones p1662 et p1663 était le SacI. L'enzyme utilisée pour l'analyse du clone p1664 (Δ -152/ +47) était le HindIII. La longueur des fragments obtenus a été observée sur un gel d'agarose 1%. Les bouts pleins dans les mutants ont été vérifiés par séquençage.

I-b) Construction des mutants de délétion par PCR

D'autres mutants de délétion (délétion du côté 5') ont été construits en utilisant le PCR. Les mutants de délétions, le p1680 (Δ -1733/ -1632), le p1681 (Δ -1632/ -1529), p1682 (Δ -1529/ -1430), p1683 (Δ -1430/ -1332), p1684 (Δ -1332/ -1233), ont été produits par amplification des régions appropriées par PCR et le sous-clonage de ces fragments, digérés par les enzymes de restriction HindIII et SphI, dans le vecteur PRIM-CAT qui lui aussi a été digéré par ces enzymes (voir figure 9 A).

Les amorces utilisées pour la construction des mutants de délétion p1680, 1681, 1682, 1683 et 1684 sont respectivement : p1361-F1 (5'-CCCAAGCTTCCAATACCTGCTTCATGC-3'); p1361-F2 (5'-CCCAAGCTTTGAACCTTTTGAGAGCTG-3'); p1361-F3 (5'-CCCAAGCTTACAGCTCGCCAAATCAAG-3'); p1361-F4 (5'-CCCAAGCTTCCTTTCATCACAGGGTAT-3'); p1361-F5 (5'-CCCAAGCTTAATCCCAGCACTTTGGGA-3'). L'amorce p1361-R (5'-TTACAAGCATGCACCACCAT-3') a été utilisée en combinaison avec toutes les autres amorces pour amplifier les fragments délétés.

Les mutants construits ont été analysés par amplification par PCR. Les amorces utilisées pour l'analyse des cinq mutants sont le SP6 et le p1361-R. La séquence de l'amorce SP6 est 5'-GATTTAGGTGACACTA-3' et la séquence de l'amorce p1361-R est décrite plus haut. La longueur des fragments de PCR a été vérifiée sur un gel d'agarose 2%.

Quatre autres mutants de délétion ont été construits. Le mutant p1963 (Δ -1733/ -152) a été construit en digérant le PRIM-CAT par les enzymes HindIII et MluI. Les bouts cohésifs générés ont été remplis par T4 DNA polymérase et joints par la ligation. Les mutants p1962 (Δ -1733/ -213), le p1964 (Δ -1733/ -102) et le p1965 (Δ -1733/ -52) ont été construits par amplification des fragments par PCR utilisant comme matrice le p1361 (PRIM-CAT). Ensuite, les fragments amplifiés ont

été digérés par les enzymes HindIII et SacI et sous-clonés dans le vecteur PRIM-CAT digéré avec ces enzymes (voir figure 9 B). Les amorces utilisées pour la construction des mutants de délétions p1962, p1964 et p1965 sont respectivement : p1361-F7 (5'-CCCAAGCTTGATCCTCTTCCTGGAATG-3') ; p1361-F8 (5'-CCCAAGCTTAAGTGGGAACTACAATTC-3') ; p1361-F9 (5'-CCCAAGCTTTCAGACAGCCGACCTCGG-3'). L'amorce 5'-UTR-2 (5'-GCGGCCGCGAGCTCCGGAAGCTCGCCACGGTAA-3') a été utilisée en combinaison avec toutes les autres amorces pour amplifier les fragments délétés.

L'analyse des ces mutants de délétion a été effectuée par PCR. Les amorces utilisées pour cela sont le SP6 et le 5'-UTR-2 dont les séquences sont décrites plus haut. La longueur des fragments a été vérifiée sur un d'agarose à 2%.

I-c) Construction des mutations ponctuelles

Quelques mutations ponctuelles ont été introduites dans la séquence du promoteur du gène PRIM1 par PCR. L'amplification d'une région appropriée par PCR a donné naissance à des fragments ayant des mutations ponctuelles dans leurs séquences. Ces fragments amplifiés ont été ensuite digérés avec les enzymes de restriction MluI et EagI (SacI pour la construction de mutant 1967) et sous-clonés dans le vecteur PRIM-CAT digéré avec ces deux enzymes également. Ces mutations ponctuelles introduites ont donné naissance aux trois mutants : p1673, p1672 et p1967 (voir figures 10 et 12 A). La matrice pour la construction des mutants p1672 et p1673 était le plasmide p1361, alors que la matrice utilisée pour le clonage du mutant p1967 était le plasmide p1672.

Les amorces utilisées pour la construction des mutants p1672, 1673 et 1967 sont respectivement : GCF-F (5'-CCCGAACGCGTGGGCAGATC-3') ; GCF-R (5'-AGCACGGCCGGCGTCTCTGTGACTGCGCAGGCGCTTATGG-3') ; GCF-F (5'-CCCGAACGCGTGGGCAGATC-3') ; TATA-R (5'-AGCACGGCCGGCGCCCCGCGACTGCGCAG

GCGCTTACGGCCGAGG -3') ;
 GCF-F (5'-CCCGAACGCGTGGGCAGATC-3') ; l'amorce 1361-R2 (5'-
 CGCGAGCTCCGGAACCTCGCCACGGTAAGGAT
 TACCACAGGGAATTGGCTGGAACATCACGTCTGGC-3'.

Les trois mutants ont été séquencés pour confirmer la présence des mutations ponctuelles dans certains sites.

Deux autres mutants ont été dérivés des clones p1672 et p1967. Le mutant p1968 a été construit par amplification des fragments appropriés par PCR utilisant comme amorce, les 1361-F9 et 5'-UTR-2. La matrice pour cette construction était le clone p1672. Ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction HindIII et SacI et cloné dans le plasmide p1672 (décrit plus haut) digéré, lui aussi, avec ces enzymes. Le mutant p1969 est généré par amplification par PCR utilisant comme matrice le p1967 et les amorces 1361-F9 et 5'-UTR-2. Le clonage a été effectué utilisant les mêmes enzymes que celles utilisées pour la construction du clone p1968 (voir figure 12 B).

La reconstruction du facteur GCF révisé tronqué (p1405) a été effectuée à partir d'un plasmide fourni par Dr. R. Kageyama, le pSV-2-GCF (p1410). Le pSV2-GCF qui code pour une protéine chimérique, contenait une partie des gènes codant pour le LRRFIP1, des séquences poly A et les séquences d'un gène appelé GCF. Une délétion de 327 nucléotides (incluant les gènes codant pour la protéine LRRFIP1 et les séquences poly A) est effectuée via une amplification par PCR. Le fragment généré a été digéré par les enzymes KpnI et BglII. Le fragment KpnI-BglII a été ensuite sous-cloné dans le site KpnI-BglII de pSV2-GCF. Les amorces utilisées pour la construction du p1405 sont : 1410-F3 (5'-GGGGTACCGGGCGCTCGGGCCTCG-3') ; 1410-R (5'-TTCACCTTTGAAGATCCACTGC-3').

L'analyse du clone, le p1405, a été effectuée par une digestion avec les enzymes de restriction KpnI et BglII. Le séquençage du p1405 a confirmé l'absence de mutation introduite dans le fragment amplifié par PCR.

Les enzymes de restriction HindIII, SphI, SacI, MluI, EagI, KpnI et BglII (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) ont été utilisées dans les étapes du clonage. Les digestions et ligations ont été effectuées selon le protocole du manufacturier. L'enzyme utilisée pour faire les ligations était la ligase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Le remplissage des bouts cohésifs par la T4 DNA polymérase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) a été fait également selon le protocole du manufacturier. Les amplifications par PCR ont été faites selon un protocole déjà établi [101].

Les cellules bactériennes utilisées pour faire les transformations sont les cellules *Epicurian coli XL2-Bleu MRF' ultra competent* (Stratagene). La transformation des bactéries a été effectuée selon le protocole du manufacturier. L'extraction et purification des plasmides ont été effectuées selon un protocole déjà établi [101].

La méthode de séquençage utilisée pour la vérification des clones, était la méthode de terminaison de chaîne avec des ddNTPs radioactifs (trousse Thermo Sequenase, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Québec).

II) CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION TRANSITOIRE

Les cellules humaines embryonnaires rénales transformées, les BOSC23 [97], ont été cultivées dans le DMEM supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal (5% de sérum de veau fœtal dans le cas des expériences effectuées avec la thrombine et le FVIIa) et d'une solution antibiotique/antimycotique, pénicilline G (200 U/ml), streptomycine sulfate (200 U/ml) et amphotéricine B (0,5 µg/ml) (Gibco-BRL,

Gaithersburg, MD). Les cellules ont été cultivées en monocouche dans des plaques de 6 puits de 35mm à 37°C et à 5 % de CO₂.

Les cellules ont subi un passage quelques jours avant les essais de transfection et ont été transfectées lorsqu'elles ont été de 50 à 80% confluentes. Les transfections ont été optimisées par une transfection des cellules BOSC23 avec le plasmide GFP. Les transfections transitoires des cellules BOSC23 par la lipofectamine (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) ont été effectuées selon le protocole du manufacturier. Les cellules BOSC23 ont été ensuite incubées pendant 4 h à 37°C en présence des complexes ADN-liposomes dans du milieu DMEM sans sérum. Après les quatre heures d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM avec sérum et le FVIIa (100 nM) ou la thrombine (0,1 U/ml) dans les expériences de vérification de l'effet des procoagulants sur le promoteur du gène PRIM1. L'antithrombine III (2,5 U/ml) a été ajoutée dans les expériences concernant les effets des anticoagulants sur le promoteur du gène PRIM1. Quarante-huit heures après les transfections, les cellules ont été lavées et ramassées avec du PBS sans calcium et magnésium. L'activité CAT a été mesurée par les essais CAT selon un protocole déjà établi [101] utilisant ³H- Acetyl-CoA (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, Québec). Les cellules BOSC23 non transfectées, ainsi que les cellules BOSC23 transfectées avec le vecteur contrôle (sans le promoteur PRIM1) ont été utilisées comme contrôle négatif. Le plasmide pSV2-CAT (gène CAT sous le contrôle d'un promoteur fort du virus SV40) a été utilisé comme contrôle pour les variations entre les différentes transfections. Tous les essais d'expression transitoire ont été répétés au moins trois fois, dans des expériences séparées. Les analyses statistiques, calcul des déviations standard et calcul des moyennes, ont été effectuées selon une méthode décrite par Avran Goldstein [105].

III) PRÉPARATION D'EXTRAITS NUCLÉAIRES

Des extraits nucléaires des cellules BOSC23 (transfectées par GCF ou non transfectées) ont été préparés selon une méthode présentée par Chiu et al [100] avec

quelques modifications. Les cellules sont récoltées dans une solution froide de PBS, 1 mM EDTA. Elles ont été collectées après une centrifugation à 20 000g pour 10 sec. Les culots ont été resuspendus dans 400 µl de tampon A refroidi (10 mM HEPES PH 7,9, 10 mM KCL, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 µg/ml Aprotinine, 10 µg/ml Pepstatine, 10 µg/ml Leupeptine). Les cellules resuspendues dans le tampon A ont été laissées sur glace pour 15 minutes. Ensuite 25 µl de NP-40 10% a été ajouté et les tubes ont été vortés pendant une minute à 20 000g. Le culot a été ensuite collecté par centrifugation et resuspendu dans 50 µl de tampon B à 4°C (20 mM HEPES PH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1mM DTT, 10 µg/ml Aprotinine, 10 µg/ml Pepstatine, 10 µg/ml Leupeptine). Le tout a été remué à 4°C pendant une heure. Les tubes ont été centrifugés. Le surnageant a été récupéré. La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford [99]. Les extraits ont été conservés à -80° C.

IV) EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*)

Des sondes de 63 nucléotides ont été générées par amplification par PCR utilisant du [α -³²P]-dCTP (Amersham Canada, Baie d'Urfé, Québec). Les amorces utilisées pour la génération de sondes marquées au ³²P sont : 1361-F10 (5'-GGCCATAAGCGCCTGCGCAG-3') et 1361-R3 (5'-ACCACAGGAATTGGCGGGAA-3'). Les oligonucléotides suivants sont utilisés comme sonde ou compétiteur : PRIM-GCF, 5'-GGCCATAAGCGCCTGCGCAGTCGCGGGGCCGC CGGCCGTGCTGTTCCCGCCAATTCCTGTGGT-3'; PRIM-GCF2M, 5'-GGCCATAAGC GCCTGCGCAGTCTCTGTGTCGCCTGTCGTGTTGTT CCCGCCAATTCCTGTGGT.

Les sondes ont été incubées avec 5 µg d'extrait nucléaire, 10 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2,5 mM DTT, 10% glycérol, 10 000 cpm de sonde marquée et de sondes froides comme compétiteurs. La réaction de liaison a été effectuée à la température de la pièce pendant 15 minutes. Les complexes ont été séparés sur un gel

de polyacrilamide 4% dans un tampon d'électrophorèse de basse force ionique (1M Tris- HCl, pH 7,9, 1M Acétate de sodium, 0,5M EDTA, pH 8,0) à 100 V [98]. Le gel a été exposé à un film XAR (Kodak) à -80°C, avec des écrans d'amplification du signal.

V) BASES DE DONNÉES ET LOGICIELS UTILISÉS

Prophet 5.0 a été utilisé pour choisir les enzymes de restriction et les amorces utilisées pour faire les constructions (BBN Systems and Technologies, Burlington, MA, and NIH, Bethesda, MD).

Une recherche en ligne par le logiciel TESS (*Transcription element search software*) a été utilisée pour établir les sites de liaison potentiels à certains facteurs de transcription comme le facteur GCF dans la région promotrice de PRIM1 (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>).

RÉSULTATS :

I) ANALYSE STRUCTURELLE DU PROMOTEUR PRIM1

Le clone PRIM-CAT (p1361), contenant le fragment HindIII-SacI (-1733 à +47) placé en amont du vecteur E1b CAT, a été utilisé pour la construction de nos mutants. Le promoteur PRIM1 contient des sites de restriction pour les enzymes HindIII, SphI, MluI et SacI. Ces sites de restriction ont été utilisés pour la construction des mutants de délétion (voir figure 6). Les résultats obtenus après avoir soumis la séquence du promoteur du gène PRIM1 au logiciel TESS montrent la présence de plusieurs sites de liaison pour quelques facteurs de transcription. La plupart de ceux-ci se trouvent près du codon d'initiation de la transcription. Ainsi, la présence des sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription **Sp1** (-188 à -183, -150 à -145, -82 à -77, -31 à -24 et +7 à +12), **E2F-1** (+5 à +12 et +43 à +50) et **GCF** (-17 à -11 et -6 à +4) dans la région entre les sites de restriction pour MluI et SacI située à l'extrémité 3' du promoteur PRIM1, a été démontrée (voir figure 7).

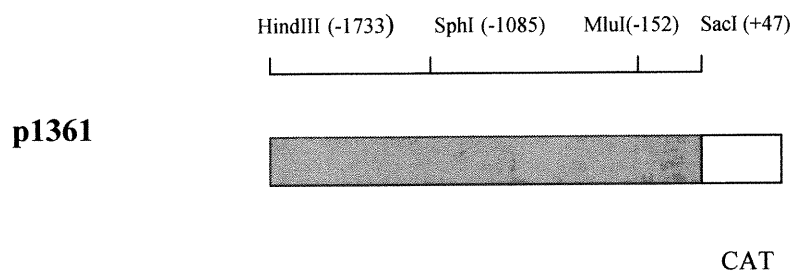


Figure 6. Présentation des sites de restriction HindIII, SphI, MluI et SacI dans le promoteur du gène PRIM1. Les coordonnées des sites de restriction sont marquées entre parenthèse.

```

-0229 ATTCCACCTTTGGATCCTCTTCCTGGAATGGACGCGCCTTCTGCCACA
                                     -----> Sp1

-0179 AGAGCGGTGGCCCTAGTGCCCGAACCGTGGGCAGATCGCAAACCTCTGCC
                                     <----- Sp1

-0129 TCTCCCGCAGCCCCCGCGCGACCAAGTGGGAActACAATTCCCGGCGGC
                                     <--

-0079 CCCGGCGGACTGCGGGCCCGGGTCAGACAGCCGACCTCGGCCATAAGC
    ---Sp1                                     -----> TBP
-0029 GCCTGCGCAGTTCGCGGGGCCCGCGCCGTGCTGTCCCGCCAATTCCTGT
    GCF <-----> GCF
    <----- Sp1      <----- Sp1      -----> E2F-1
                                     -----> Sp1

+0022 GGTAATCCTTACCGTGGCGAGTTCGCGCTCAATG (+56)
                                     Met-1
                                     -----> E2F-1

                                     Transcr.
                                     ---->
TCGCGGGGCCCGCGCCGTGCTG
<----->
    GCF          GCF

```

Figure 7. Présentation d'une partie des séquences promotrices du gène PRIM1 importantes pour sa transcription, ainsi que présentation des sites de liaison pour les facteurs GCF, Sp1 et E2F-1. Le site putatif d'initiation de la transcription est marqué par un grand G. La boîte TATA proposée par les logiciels informatiques est soulignée.

I-a) Analyse des mutants de délétion

Pour identifier les séquences promotrices PRIM1, impliquées dans la régulation d'expression du gène PRIM1, on a construit quelques mutants de la partie 5' de ce gène. Ces mutants dérivent du clone p1361 (voir figure 6). Ce clone et les mutants ont été transfectés dans les cellules BOSC23 et l'activité CAT a été mesurée. La délétion des fragments HindIII-SphI et SphI-MluI de la partie 5' du gène PRIM1 ne diminue pas l'activité du gène CAT, tandis que la délétion du fragment MluI-SacI baisse l'activité CAT de façon importante (voir figure 8).

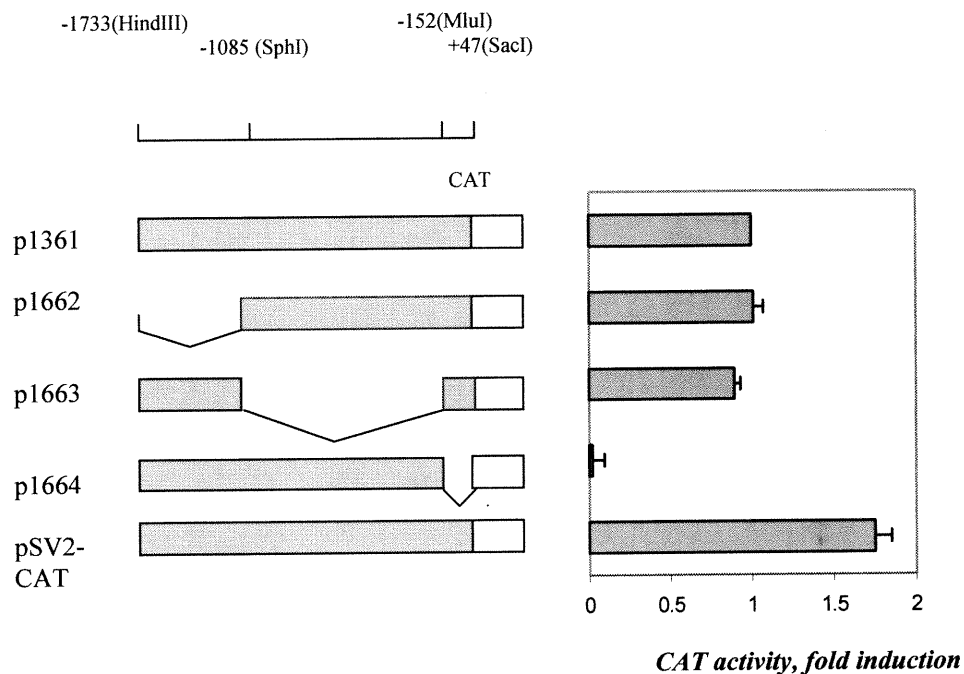


Figure 8. Activité du promoteur de PRIM1 dans les mutants de délétion p1662, p1663 et p1664. Les délétions dans la partie 5' du gène PRIM1 ont été effectuées à l'aide des enzymes de restriction HindIII, SphI, MluI et SacI. Le plasmide pSV2-CAT constitue le contrôle positif (gène CAT sous le contrôle du promoteur du virus SV40). L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Les résultats de la figure 8 nous indiquent que le fragment MluI-SacI contient les séquences essentielles pour l'activité du promoteur PRIM1. Pour déterminer les régions précises nécessaires pour l'activité du promoteur PRIM1, nous avons construit plusieurs autres mutants de délétion (voir figure 9 A et B). La région SphI-MluI contient majoritairement des séquences répétitives Alu.

On n'observe pas de réduction d'activité CAT dans le cas des mutants p1680 à p1683. Cependant, l'augmentation d'activité CAT observée dans le cas de ces mutants n'est pas significative. La délétion de la région entre -1733 et -1233 dans le mutant p1684 cause une baisse non significative d'activité CAT. Donc, la région -1733 à -1233 ne semble pas être importante pour l'activité du promoteur du gène PRIM1.

Aucune réduction d'activité CAT n'a été observée dans le cas de délétions en amont de la position -152 (mutants p1962 et p1963). Par contre, la délétion de la région -1733 à -102 (mutant p1964) inhibe l'activité CAT à 60% de son niveau initial. Une délétion allant jusqu'à position -52 (mutant p1965) baisse l'activité du CAT à 21% de son niveau initial.

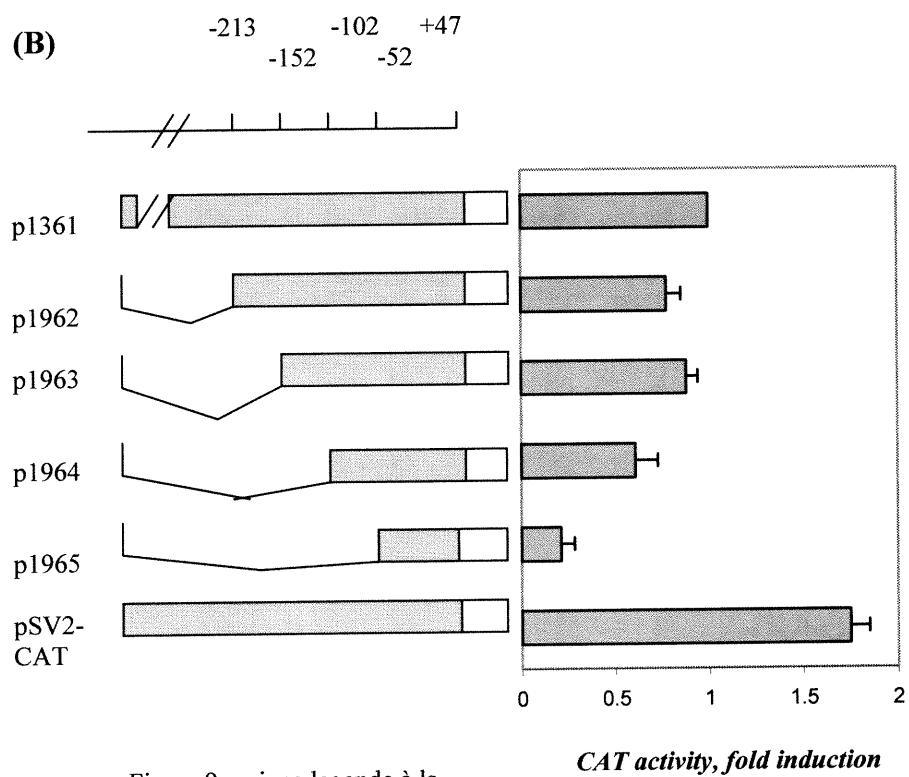
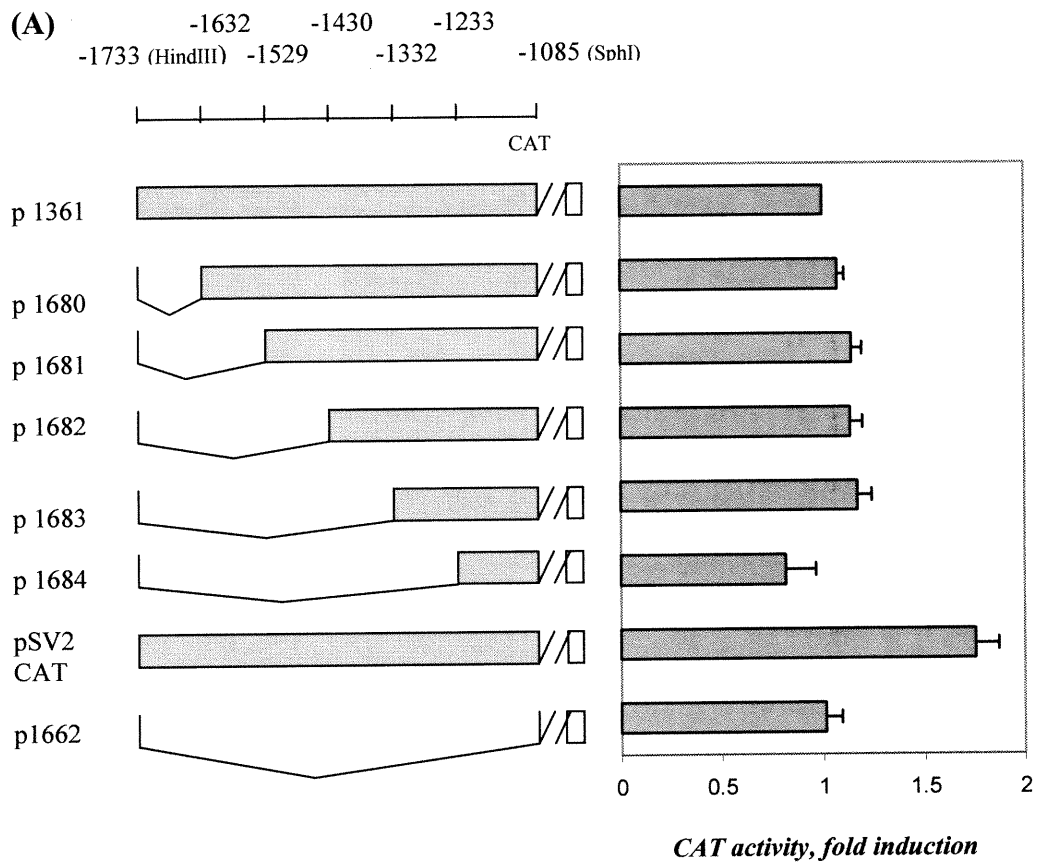


Figure 9: voir sa legende à la page suivante

Figure 9. Activité transcriptionnelle des différentes régions du promoteur PRIM1. **(A)** Des mutants de délétions du promoteur PRIM1, p1680 (Δ -1733/ -1632), p1681(Δ - 1733/ -1529), p1682 (Δ -1733/-1430), p1683 (Δ -1733/ -1332) et p1684 (Δ -1733/ -1233), ont été construits et placés en amont du gène rapporteur CAT. **(B)** Autres mutants de délétions du promoteur PRIM1 ont été construits et placés en amont du gène CAT. L'activité CAT des mutants de délétions, p1962 (Δ -1733/ -213), p1963 (Δ -1733/ -152), p1964 (Δ -1733/ -102) et le p1965 (Δ -1733/ -52), a été mesurée. Le pSV2-CAT est utilisé comme contrôle positif. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361. Les données dans la figure 9 A et B représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent que la région en aval de -152 est importante pour la transcription du gène PRIM1. Cette région contient des sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription Sp1 et E2F-1 (voir figure 7).

I-b) Analyse de mutation ponctuelle dans la boîte TATA

Enfin, deux recherches informatiques, *Promoter recognition NNPP2.1* et *Promoter scan II* ont proposé une boîte TATA putative à la position -36 à -32 (voir figure 7). Pour confirmer si ces séquences ont la fonction d'une boîte TATA, nous avons introduit une mutation ponctuelle dans la séquence putative de la boîte TATA proposée par les logiciels d'analyse de données. L'introduction d'une mutation ponctuelle dans la boîte TATA putative ne mène pas à une baisse significative de l'activité CAT (voir figure 10).

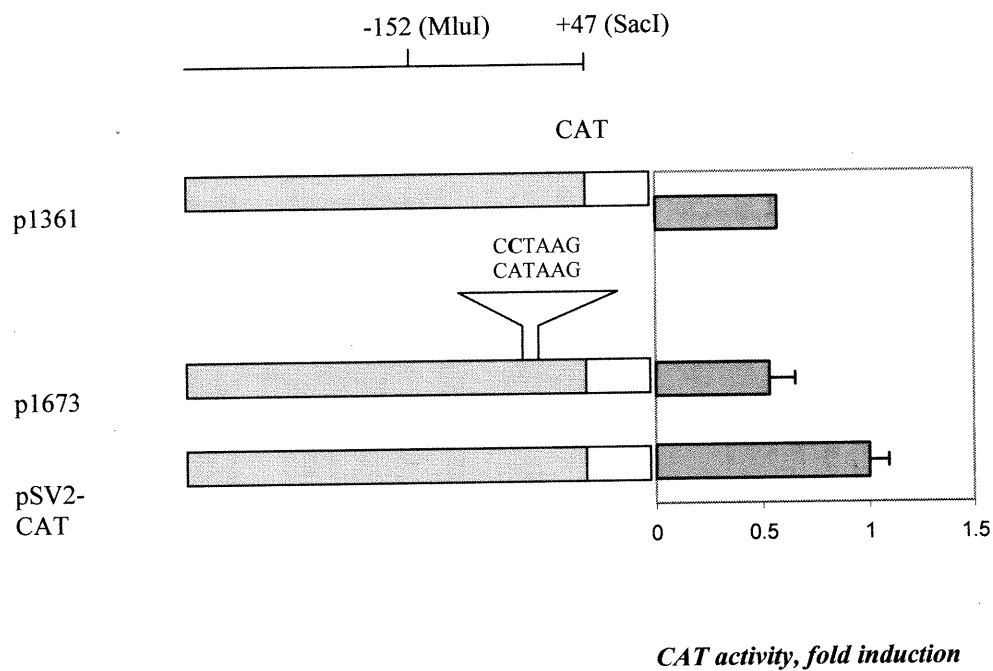


Figure 10. Présentation des changements de l'activité CAT suite à l'introduction d'une mutation ponctuelle (p1673) dans la boîte TATA putative par rapport à l'activité du promoteur PRIM1 sauvage (p1361). La mutation ponctuelle est présentée en caractère gras. Le pSV2-CAT est utilisé comme contrôle positif. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'introduction de mutation ponctuelle dans la séquence suggérée comme étant une boîte TATA, ne baisse pas l'activité du promoteur. Ceci suggère que le promoteur PRIM1 n'a pas de boîte TATA fonctionnelle.

II) L'EFFET DU FACTEUR GCF SUR LE PROMOTEUR DU GÈNE PRIM1

Un de nos objectifs était de trouver un répresseur qui puisse inhiber l'activité du promoteur PRIM1. Comme déjà mentionné, la recherche TESS nous suggère deux sites de liaison pour un facteur répresseur dérivé d'un artefact de clonage, le facteur GCF (voir figure 11)

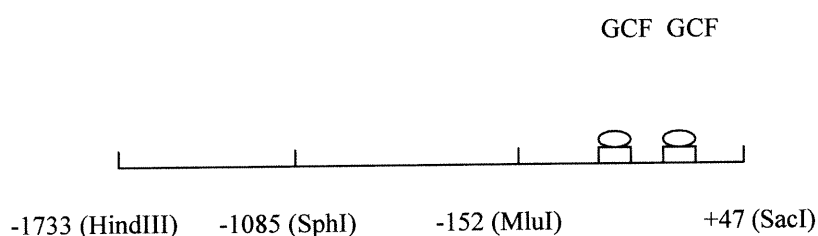


Figure 11. Présentation des deux sites de liaison du facteur GCF.

Afin de voir si le facteur GCF révisé (séparé de la protéine LRRFIP1) est un répresseur du promoteur PRIM1, nous avons enlevé les séquences codant pour la protéine tronquée LRRFIP1 et nous avons effectué une cotransfection des cellules BOSC23 par le gène codant pour le facteur GCF reconstruit et le promoteur sauvage ou le promoteur muté dans les sites de liaison putatifs du facteur GCF (voir figure 12 A). Afin de s'assurer que le facteur GCF réprime le promoteur PRIM1 via les deux sites de liaison putatifs au facteur GCF (-17 à -11 et -6 à +4), nous avons délété des séquences riches en GC se trouvant en amont de la position -52 du promoteur PRIM1, dans les clones 1672 et 1967, ayant des mutations ponctuelles dans les sites de liaison

du GCF, et nous avons généré deux nouveaux mutants (p1969 et p1968). Les cotransfections du facteur GCF avec les nouveaux mutants p1969 et p1968, ainsi que le clone p1965 sont présentées dans la figure 12 B.

On constate une diminution d'activité CAT suite à des cotransfections des cellules BOSC23 par le gène codant pour le facteur GCF reconstruit et le promoteur sauvage PRIM1 (p1361). Dans ce cas, l'activité CAT diminue à ~8% de son niveau initial. Une cotransfection des cellules BOSC23 par le gène codant pour le facteur GCF reconstruit et le promoteur PRIM1 muté dans un des sites de liaison (-17 à -11) du facteur GCF (clone p1672), baisse l'activité CAT à 94% de son niveau initial. Donc, lorsque les sites putatifs de liaison du facteur GCF contiennent des mutations ponctuelles, l'activité CAT ne baisse pas de façon significative (dans le cas du plasmide 1672) suite à une cotransfection de ce clone et le gène codant pour le facteur GCF.

Le facteur GCF reconstruit (p1405) cotransfecté avec le promoteur minimal (p1965) sauvage cause une diminution d'activité CAT à 4% de son activité initiale. Cependant, le facteur GCF ne diminue pas l'activité CAT dans les clones p1968 et p1969 ayant des mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du facteur GCF. L'activité CAT dans le clone p1968, contenant le promoteur PRIM1 délété et muté dans un des sites de liaison putatifs du GCF, est réduite à 84% de son activité initiale. Dans le cas du clone p1969, contenant le promoteur PRIM1 délété et muté dans les deux sites putatifs de liaison du GCF, il n'y a pas de réduction d'activité CAT (voir figure 12 B).

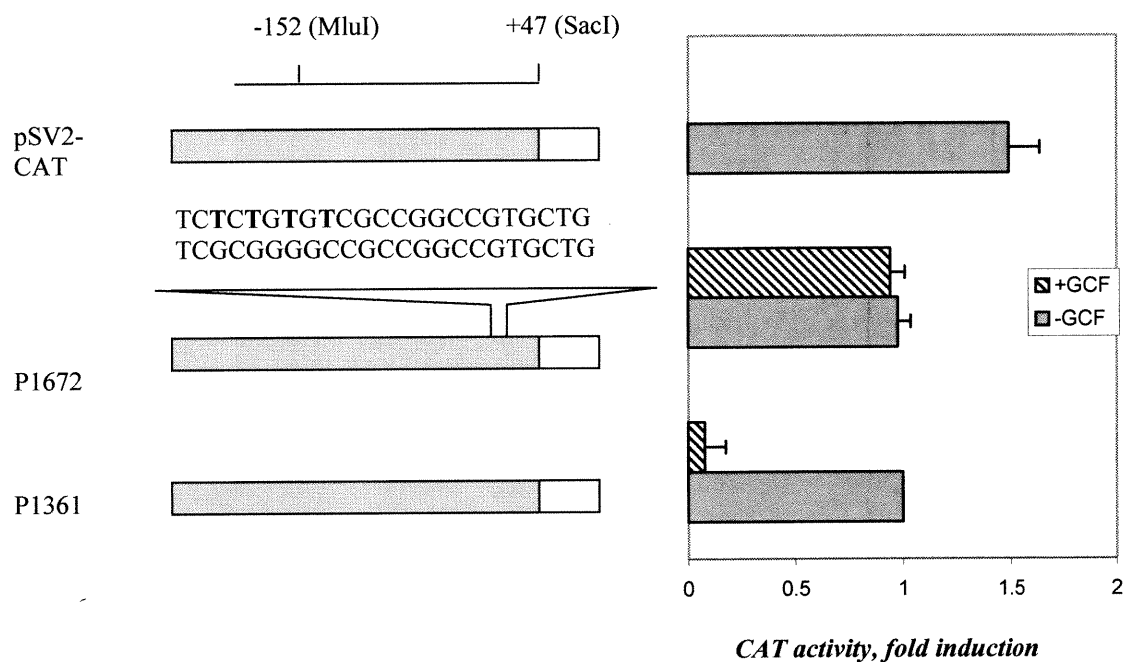


Figure 12. (A) L'effet de facteur GCF reconstruit (p1405) sur le promoteur PRIM1 sauvage, ainsi que le promoteur PRIM1 muté (p1672). Le clone p1672 comporte quatre mutations dans un des sites putatifs de liaison à GCF. Le clones p1672 et le promoteur sauvage ont été cotransfectés avec le gène codant pour le facteur GCF reconstruit dans des cellules BOSC23 et l'activité CAT a été mesurée. Les mutations ponctuelles sont en caractères gras. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361. Toutes les transfections ont été répétées trois fois.

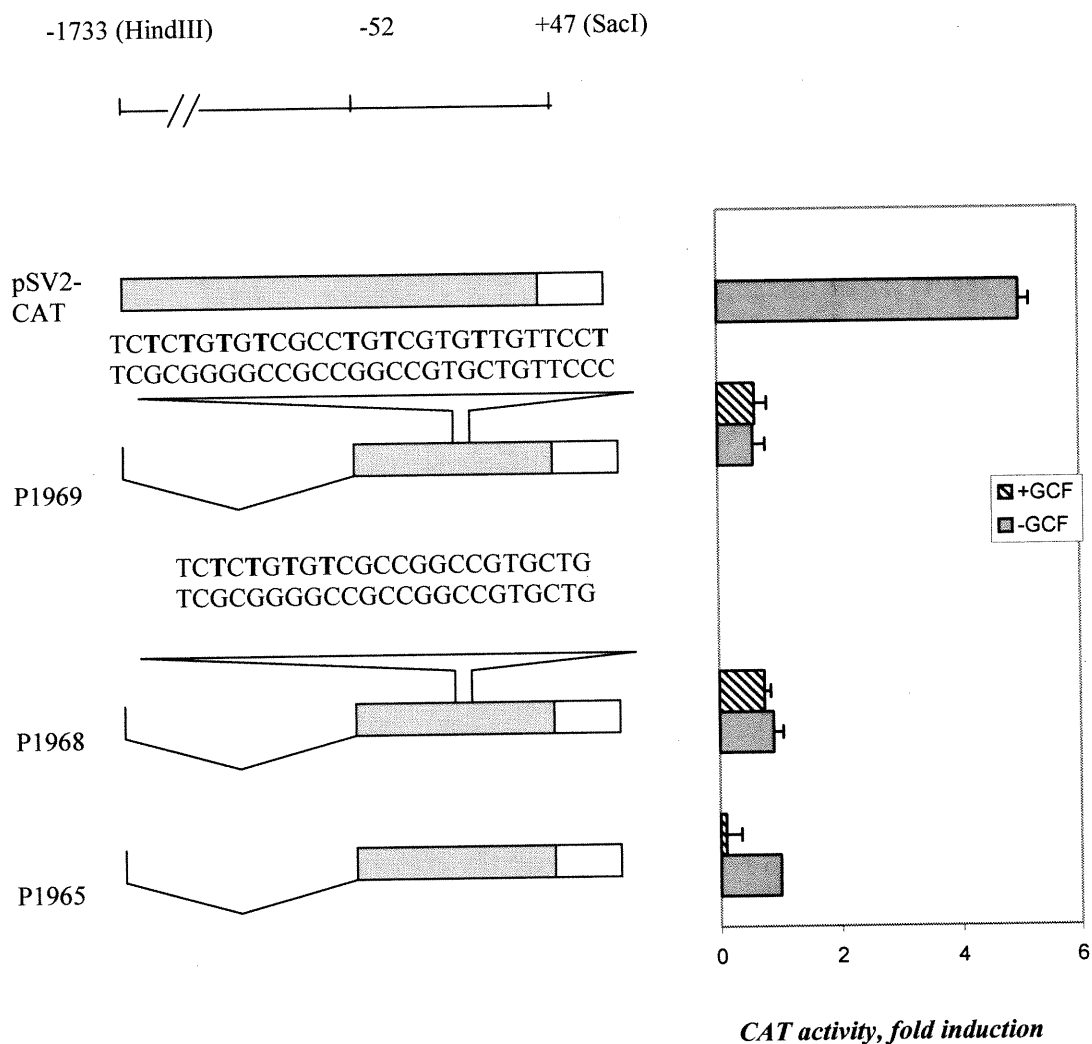


Figure 12. (B) L'effet du facteur GCF reconstruit (p1405) sur le promoteur minimal du gène PRIM1 (p1965), ainsi que sur le promoteur minimal PRIM1 ayant des mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du GCF (les clones p1968 et p1969). Dans le promoteur minimal les séquences en amont de la position -52 sont déléetées. Les mutations ponctuelles sont en caractères gras. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1965. Toutes les transfections ont été répétées trois fois.

Selon les résultats, le GCF reconstruit réprime fortement l'activité du promoteur PRIM1 sauvage. Les résultats de cotransfection du facteur GCF avec le clone contenant le promoteur muté dans les sites de liaison du facteur GCF, p1672, ainsi que les clones délétés et mutés dans les sites putatifs de liaison du facteur GCF, p1968 et p1969, indiquent que les sites putatifs de liaison du facteur GCF sont fonctionnels. Les sites putatifs de liaison du facteur GCF couvrent le site du début de la transcription et 19 nucléotides en amont de ce site (voir figure 7).

Afin de voir s'il y a une liaison du facteur GCF ou d'autres protéines aux sites de liaison putatifs pour GCF (-17 à -11 et -6 à +4), nous avons effectué un EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*). Les deux sondes radioactives, utilisées pour faire le EMSA, sont : PRIM GCF et PRIM GCF 2M (contiennent la région allant de -39 à +24 du promoteur PRIM1). La dernière est caractérisée par sept mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du facteur GCF (voir section matériels et méthodes pour la séquence des sondes radioactives et les compétiteurs). Des fragments de PCR, générés par les amorces 1361-F10 et 1361-R3, ont été utilisés comme compétiteur (voir matériels et méthodes pour la séquences des amorces).

La figure 13 A démontre que les protéines dans les extraits nucléaires provenant des cellules BOSC23 transfectées avec le facteur GCF, à une concentration de 4 µg/µl, lient la sonde et cause une rétention complète de la sonde dans la partie supérieure du gel (ligne 3). Or, plus on diminue la concentration des extraits nucléaires, plus on augmente la quantité de la sonde libre (ligne 4, 5 et 6). Donc on constate qu'il y a des protéines dans les extraits nucléaires qui lient la sonde. Dans la figure 13 B, on voit que les protéines existantes dans les extraits nucléaires provenant des cellules BOSC23 transfectées avec le facteur GCF se lient à la sonde PRIM-GCF en absence de compétiteur (ligne 2). Plus on augmente la concentration de sonde non marquée PRIM-GCF, utilisée comme compétiteur, plus on augmente la quantité de sonde libre radioactive, la PRIM-GCF (lignes 3, 4 et 5). La bande la moins mobile dans la figure 13 B, ligne 3 et 4, disparaît lorsqu'on augmente la concentration de la sonde sauvage (PRIM GCF froide) utilisée comme compétiteur (ligne 5). Par contre,

cette bande ne disparaît pas lorsqu'on utilise la sonde mutée (PRIM-GCF 2M) comme compétiteur (ligne 8). La sonde PRIM-GCF 2M non marquée, mutée dans les motifs de liaison à GCF est moins efficace comme compétiteur que la sonde PRIM-GCF non mutée. Cela indique qu'il y a une liaison protéique spécifique (probablement du facteur GCF) aux motifs de liaison pour le facteur GCF. Selon la figure 13 C, le profil de liaison protéique à la sonde PRIM-GCF 2M, utilisant les extraits nucléaires provenant des cellules BOSC23 non transfectées (ligne 6), n'est pas différent du profil de liaison protéique à la même sonde, utilisant les extraits nucléaires provenant des cellules BOSC23 transfectées par le gène codant le facteur GCF (ligne 8). Par contre, le profil de liaison protéique à la sonde PRIM-GCF marquée, utilisant les extraits nucléaires provenant des cellules BOSC23 non transfectées (ligne 2) est différent du profil de liaison protéique à la même sonde en présence des extraits nucléaires provenant des cellules transfectées par le gène codant pour le facteur GCF (ligne 4).

(A)

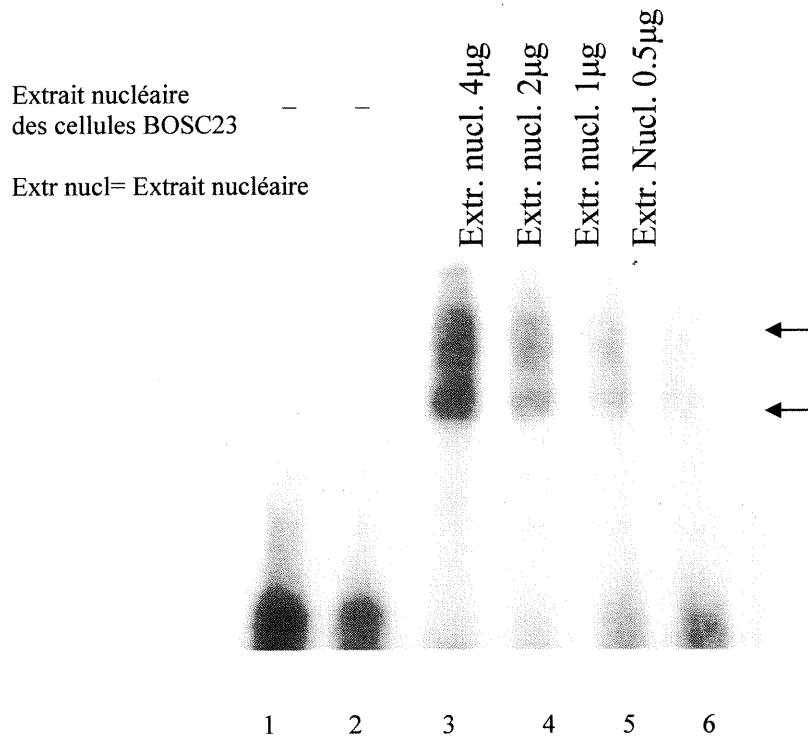


Figure 13. (A) Vérification de liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison du facteur GCF, utilisant différentes concentrations d'extrait nucléaire. L'EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) a été effectué avec la sonde PRIM-GCF radioactive et 4 différentes concentrations, 4 µg/µl (ligne 3), 2 µg/µl (ligne 4), 1 µg/µl (ligne 5) et 0,5 µg/µl (ligne 6), d'extrait nucléaire provenant des cellules BOS23 transfectées avec le gène qui code le facteur GCF. La sonde non marquée PRIM-GCF 2M à une concentration de 4x a été utilisée comme compétiteur. Il n'y a pas d'extrait nucléaire pour les lignes 1 et 2. Les flèches correspondent aux complexes PRIM GCF-protéines.

(B)

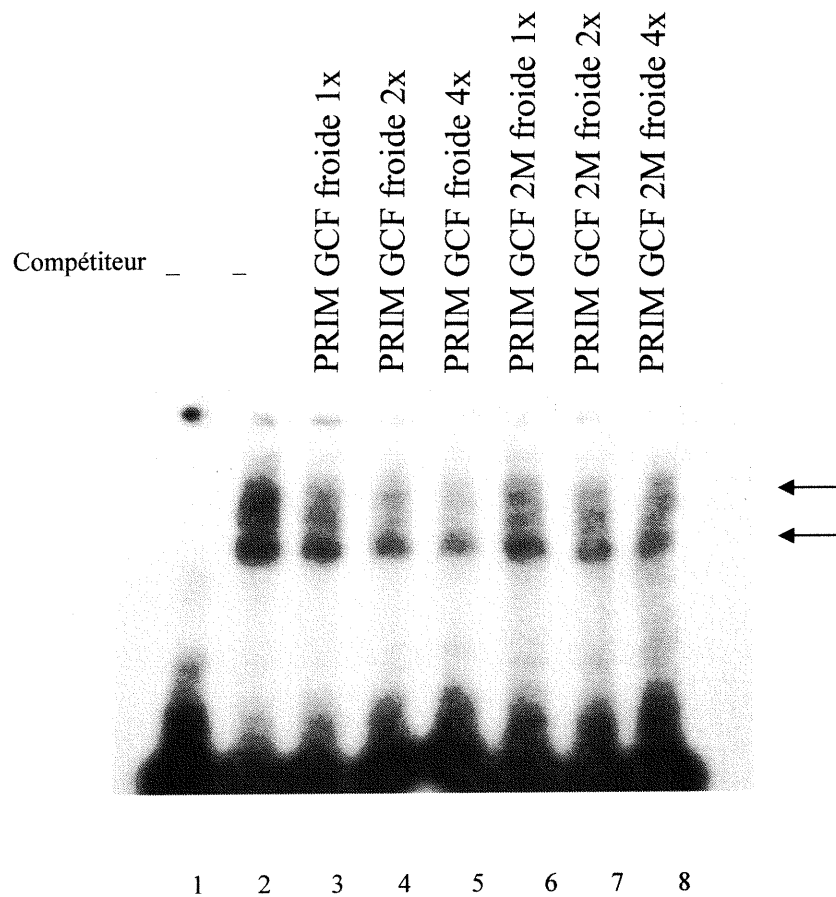


Figure 13. (B) Vérification de liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison du facteur GCF en présence de différentes concentrations de compétiteur. L' EMSA a été effectué en absence (ligne 2) ou en présence de différentes concentrations (1x, 2x, 4x) de sonde PRIM-GCF (lignes 3 à 5) et PRIM-GCF 2M (lignes 6 à 8), non marquées comme compétiteur. La sonde radioactive utilisée dans cette expérience était le PRIM-GCF. Les extraits nucléaires provenaient des cellules BOS23 transfectées avec le gène codant pour le facteur GCF. Pour la ligne 1, il n'y a pas d'extrait nucléaire. Les flèches correspondent aux complexes PRIM GCF-protéines.

(C)

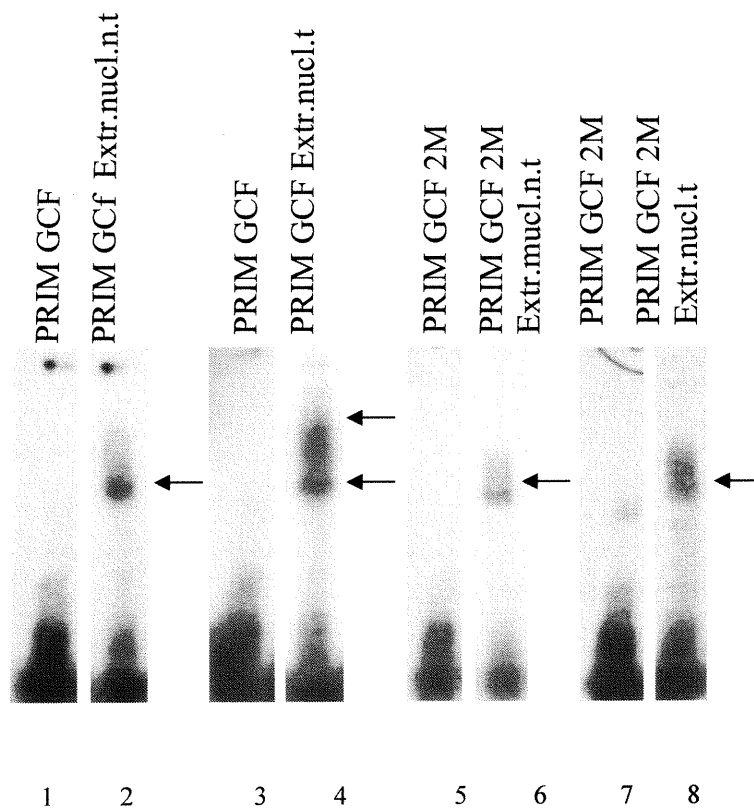


Figure 13. (C) Vérification de liaison entre certaines protéines des extraits nucléaires et les sites de liaison sauvages et mutés pour le facteur GCF. L'EMSA a été effectué avec les sondes PRIM-GCF (lignes 1 à 4) et PRIM-GCF 2M (lignes 5 à 8) marquées. Nous avons utilisé des extraits nucléaires provenant des cellules non transfectées (lignes 2 et 6), ainsi que des extraits nucléaires provenant des cellules transfectées avec le gène codant le facteur GCF (lignes 4 et 8). La sonde non marquée PRIM-GCF 2M a été utilisée comme compétiteur (concentration 4x). Les flèches correspondent aux complexes PRIM GCF-protéines.

Donc, il semble que le facteur GCF, existant en grande quantité dans les extraits nucléaires provenant des cellules transfectées avec le gène codant pour le facteur GCF, agit de façon directe ou indirecte sur ses sites putatifs de liaison. Le facteur GCF ne peut pas se lier à l'ADN, lorsque ses sites de liaison sont mutés.

III) RÔLE DES PROCOAGULANTS ET ANTICOAGULANTS AU NIVEAU DU PROMOTEUR DU GÈNE PRIM1

III-a) Rôle du FVIIa et de la thrombine

Le FVIIa et la thrombine activent une ou plusieurs voies de transduction du signal finissant par l'activation de transcription du promoteur PRIM1.

Les transfections des cellules BOSC23 par le promoteur du gène PRIM1 en présence de la thrombine ont montré que cette dernière, à une concentration de 0,1 U/ml, augmente environ 2,5 fois le niveau d'activité CAT. D'autre part, l'ajout du FVIIa (100 nM) augmente environ 2 fois le niveau d'activité CAT (voir figure 14).

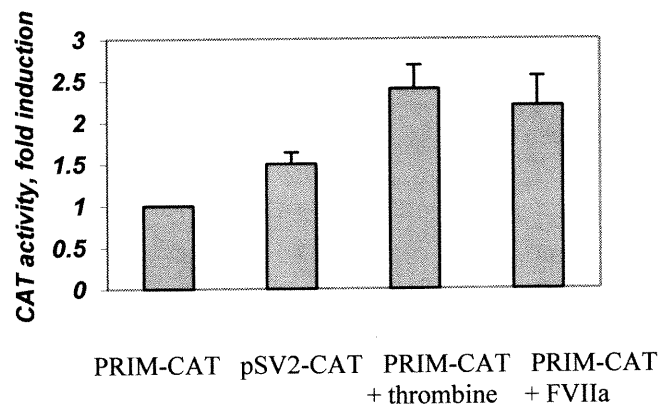


Figure 14. L'effet de la thrombine (0,1 U/ml) et de FVIIa (100 nM) sur le promoteur PRIM1. Le pSV2-CAT est utilisé comme contrôle positif. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361 (PRIM-CAT). Toutes les transfections ont été répétées trois fois.

III-b) Rôle de l'antithrombine III sur l'activité du promoteur de PRIM1

Le produit du gène PRIM1 est nécessaire pour l'initiation de la réplication. Le promoteur PRIM1 est activé par la thrombine (agent mitogénique), le facteur VII activé. L'antithrombine III par sa fonction d'antagoniste de la thrombine et du facteur VII activé est une excellente candidate pour l'inhibition de l'expression du gène PRIM1. Donc, nous avons vérifié l'effet de cet anticoagulant sur le promoteur PRIM1.

Les transfections des cellules BOSC23 par le promoteur du gène PRIM1 en présence de l'antithrombine III ont montré que cette dernière (2,5 U/ml) diminue deux fois l'activité CAT (voir figure 15). Ces résultats nous ont mené à chercher les séquences du promoteur qui répondent à l'antithrombine III.

Pour trouver la région du promoteur qui répond à l'antithrombine III, nous avons effectué des transfections des cellules BOSC23 par les mutants de délétion p1682 (Δ -1529/ -1432), p1683 (Δ -1432/ -1332), p1684 (Δ -1332/ -1233), p1662 (Δ -1733/ -1085), p1962 (Δ -1733/ -213), p1963 (Δ -1733/ -152), p1964 (Δ -1733/ -102) et p1965 (Δ -1733/ -52) et nous avons vérifié l'effet de l'antithrombine III (voir figure 15 A et B). Tel que représenté sur la figure, l'antithrombine III diminue environ deux fois l'activité CAT dans les mutants de délétion p1682, 1683, 1684, 1662 et 1962. Cependant, lorsque l'antithrombine III est ajoutée aux cellules transfectées par les clones p1963, p1964 et p1965, on n'observe pas de diminution significative de l'activité CAT par l'antithrombine III. Autrement dit, l'inhibition de l'activité du promoteur PRIM1 par l'antithrombine III est conservée après une délétion de toutes les séquences en amont de la position -213, tandis que l'inhibition de l'activité du promoteur PRIM1 par l'antithrombine III n'est pas conservée lorsque les séquences se trouvant en aval de la position -213 sont délétées.

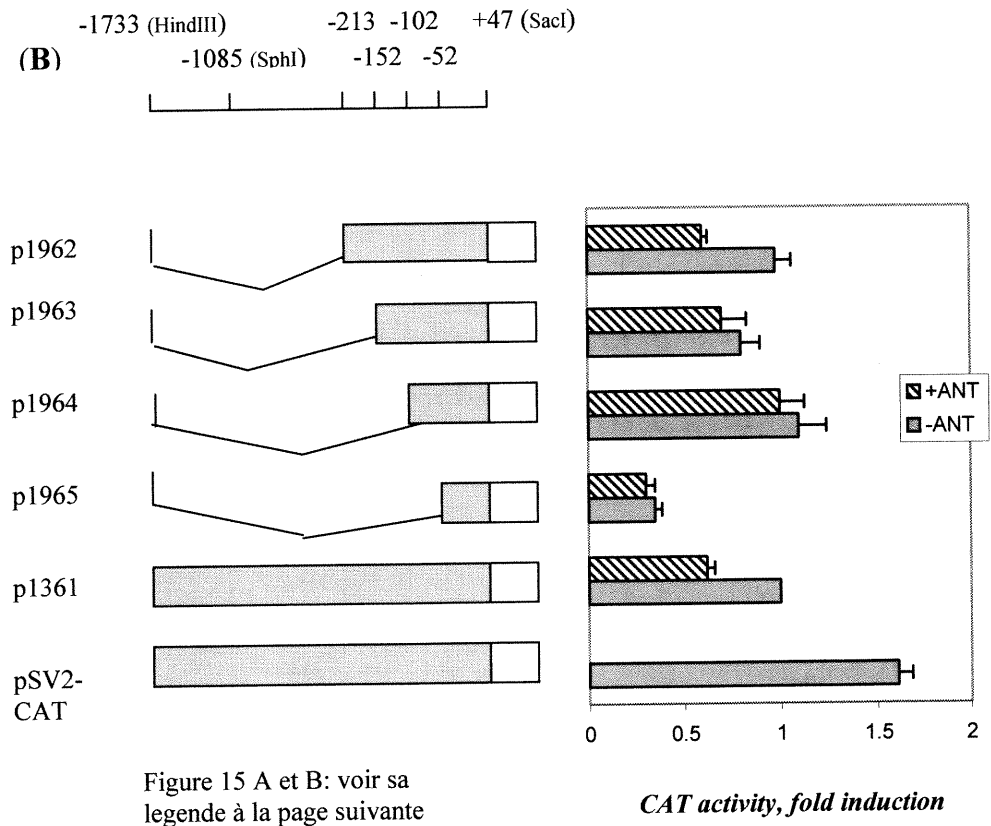
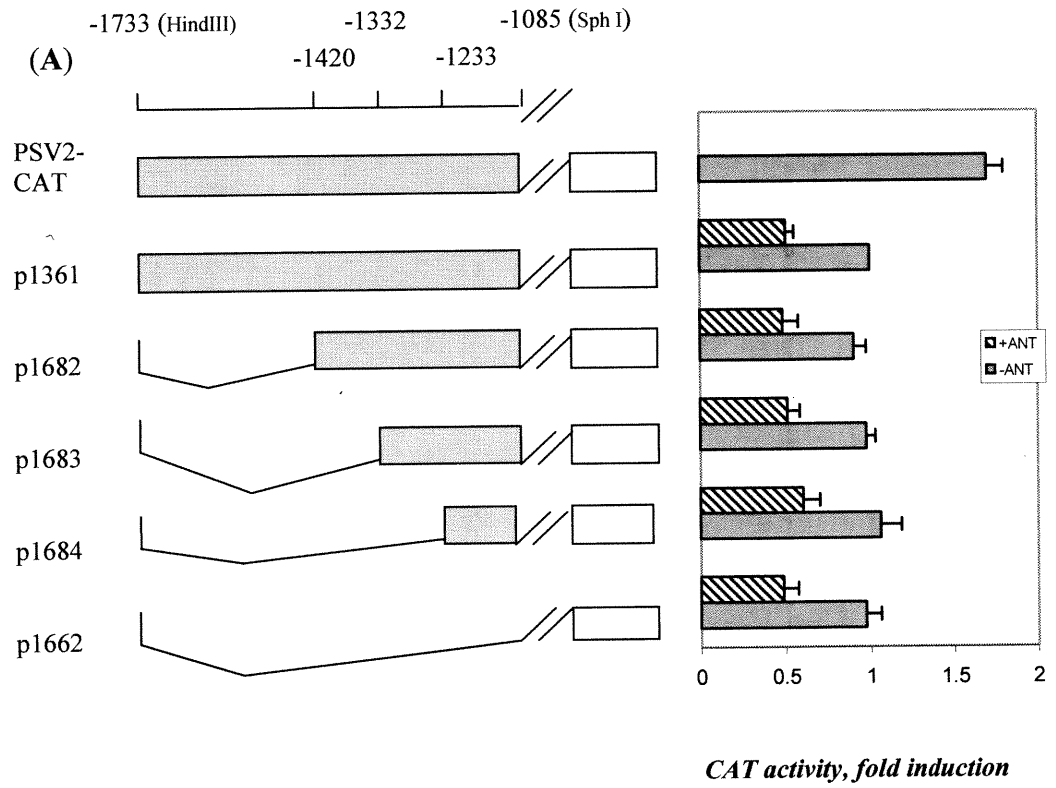


Figure 15 A et B: voir sa legende à la page suivante

Figure 15. (A) Résultats préliminaires d'identification des séquences du promoteur PRIM1 qui répondent à l'antithrombine III. L'activité CAT a été mesurée après une transfection des cellules BOSC23 par le promoteur sauvage PRIM1 et les mutants de délétion p1682 (Δ -1520/ -1430), p1683 (Δ -1420/ -1332), p1684 (Δ -1332/ -1232) et p1662 (Δ -1085/ -1133) en présence d'une quantité de 2,5 unités/ml d'antithrombine III. **(B)** L'activité CAT a été mesurée après une transfection des cellules BOSC23 par le promoteur sauvage (p1361) et les mutants de délétion p1962 (Δ -1733/ -213), p1963 (Δ -1733/ -152), p1964 (Δ -1733/ -102) et p1965 (Δ -1733/ -52) en présence d'une quantité de 2,5 unités/ml d'antithrombine III. L'activité CAT a été exprimée relative à l'activité CAT du p1361. Toutes les transfections ont été répétées trois fois.

L'antithrombine III, à une concentration de 2,5 U/ml, inhibe l'activité du promoteur PRIM1. Ce résultat nous a mené à chercher les séquences du promoteur qui répondent à l'antithrombine III.

D'après les résultats des transfections des cellules BOSC23 par les mutants de délétion en présence de l'antithrombine III, la région qui répond à l'antithrombine III est située entre la position -203 et -152 du promoteur PRIM1.

DISCUSSION

Nous avons analysé les différentes régions du promoteur du gène PRIM1. Nous avons utilisé des constructions PRIM-CAT pour étudier l'activation et la répression du promoteur PRIM1. L'activité CAT a été mesurée en valeur absolue (comptes par minute). L'activité CAT en valeur absolue augmente selon le temps d'incubation des extraits des cellules transfectées en présence du liquide de scintillation avant les comptages. Dans nos expériences, les valeurs absolues de l'activité CAT étaient très variables d'une expérience à une autre, parce que le temps d'incubation des extraits cellulaires n'était pas le même dans toutes les expériences. Donc, nous avons présenté les résultats (l'activité CAT) en valeur relative. Selon nos résultats, le promoteur du gène PRIM1 n'a pas de boîte TATA fonctionnelle. Cependant, il contient des séquences riches en GC. Les séquences riches en GC sont des éléments typiques pour plusieurs promoteurs des gènes qu'on appelle constitutif et les oncogènes cellulaires [7, 11, 12, 81 et 96]. La plupart des promoteurs qui n'ont pas de boîte TATA contiennent plusieurs sites de liaison pour le facteur Sp1. Le facteur Sp1 interagit avec le TAF110 et il est impliqué dans l'activation de transcription de plusieurs promoteurs qui n'ont pas de boîte TATA [8]. D'après les recherches TESS, le promoteur du gène PRIM1 contient plusieurs sites de liaison putatifs pour le facteur Sp1. Il a été démontré chez la souris que la transcription basale des trois sous-unités de l'ADN polymérase α -primase, p54, p180 et p68, est contrôlée par le facteur Sp1. Cependant, la sous-unité p46 ne lie pas le facteur Sp1. Les facteurs impliqués dans la transcription basale de cette sous-unité ne sont pas connus [11 et 82]. Pour évaluer le rôle de Sp1 dans la transcription basale du promoteur PRIM1, il faut voir si les sites putatifs de liaison au facteur Sp1 sont fonctionnels. Pour identifier des séquences importantes pour la régulation de la transcription du gène PRIM1, nous avons construit des mutants de délétion. Les transfections transitoires des cellules BOSC23 par ces constructions ont montré que l'enlèvement des séquences en amont de la position -152 n'affecte pas l'activité du promoteur. Par contre, la délétion de la région allant de -152 à +47 du promoteur PRIM1 inhibe complètement l'activité du promoteur PRIM1. Cette région contient

les séquences riches en GC. Pour déterminer de façon plus précise les séquences importantes pour l'activité du promoteur PRIM1, nous avons disséqué la région -152 à +47. Les résultats de transfection montrent que les séquences entre -152 à -52 sont importantes pour la transcription du gène PRIM1. Il existe des sites de liaison putatifs (-150 à -145, -82 à -77) pour le facteur Sp1 dans cette région. Ainsi, lorsqu'on enlève cette région on constate une diminution significative d'activité du promoteur PRIM1, mais l'activité du promoteur n'est pas complètement perdue. Donc, il y a des séquences nécessaires pour l'activité du promoteur PRIM1 dans la région -52 à +47. Cette dernière contient des motifs de liaison pour Sp1 (-31 à -24 et +7 à +12), GCF (-17 à -11 et -6 à +4) et E2F-1 (+5 à +12 et +43 à +50). Notre étude n'exclut pas un rôle potentiel de Sp1 dans la transcription basale du gène PRIM1. Nous nous sommes attardés sur le facteur GCF, connu comme étant un répresseur de transcription. Le facteur Sp1 et le facteur GCF reconnaissent les séquences riches en GC. Il est possible qu'un équilibre entre le GCF (régulateur négatif) et le Sp1 (régulateur positif) puisse jouer un rôle important dans la régulation du gène PRIM1. Cependant, toutes les séquences riches en GC ne sont pas reconnues par ces facteurs. Par exemple, le facteur Sp1 n'interagit pas avec certains sites de liaison du facteur Sp1 dans le promoteur EGFR [95]. L'affinité avec laquelle un facteur se lie à une séquence doit aussi être considérée.

Il existe un site de liaison putatif du facteur E2F-1 dans le promoteur du gène PRIM1, comme on a déjà mentionné précédemment. Des études effectuées sur la régulation de transcription des sous-unités de l'ADN polymérase α -primase chez la souris ont montré que le facteur E2F-1 augmente la transcription dépendant de la croissance [82]. Les études effectuées sur le promoteur de la petite sous-unité de la primase chez la souris ont également démontré que les sites de liaison du facteur E2F-1 sont localisés proche du site d'initiation de la transcription, ce qui concorde bien avec la présence d'un site putatif pour le E2F-1 à la position +5 à +12 du promoteur PRIM1 chez l'homme. Cependant, l'effet de ce facteur au niveau du promoteur PRIM1, ainsi que sa liaison à ce site reste à déterminer. Notre étude sur le contrôle de transcription du gène PRIM1 n'est pas exhaustive. Il y a d'autres facteurs qui peuvent

jouer un rôle important au niveau du promoteur du gène PRIM1. Par exemple, un site putatif de liaison au NF κ B a été suggéré par la recherche informatique TESS. Cependant, dans le cas de NF κ B, ce site n'a pas été révélé quand la recherche a été effectuée à plus haute stringence. Ceci suggère que le NF κ B probablement n'est pas un facteur majeur dans le contrôle de transcription du gène PRIM1. Donc nous n'avons pas ciblé le rôle du NF κ B au niveau du promoteur PRIM1 dans nos études.

À part l'identification des sites importants pour la transcription du gène PRIM1, nos recherches consistaient à trouver les mécanismes de répression du gène PRIM1, afin d'inhiber sa transcription et éventuellement inhiber le développement des tumeurs liées à la surexpression du gène PRIM1. À cet égard, nous avons approfondi nos études sur l'effet du facteur GCF et des anticoagulants au niveau du promoteur PRIM1, plutôt que d'étudier le rôle des facteurs Sp1 ou E2F-1. La fonction du facteur GCF reconstruit (séparé des domaines protéiques appartenant à la protéine LRRFIP1) n'est pas encore connue, à l'exception de nos données ci-présentées. Dans nos travaux, nous avons constaté que le GCF est un répresseur de la transcription du gène PRIM1. L'introduction des mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du facteur GCF conduit à une diminution de répression de l'activité du promoteur PRIM1 par ce facteur. Les expériences de cotransfection du facteur GCF avec le promoteur minimal PRIM1 (où toutes les séquences en amont de la position -52 ont été enlevées) montrent une diminution de l'activité du promoteur PRIM1. Par contre, les cotransfections effectuées avec le promoteur minimal PRIM1, mais ayant des mutations ponctuelles dans les sites putatifs de liaison du GCF ont révélé une diminution de répression de l'activité du promoteur du gène PRIM1 par le facteur GCF. Ces résultats suggèrent que le facteur GCF réprime l'activité du promoteur PRIM1 via ses sites de liaison qui se trouvent en aval de la position -52. Des essais d'EMSA ont été effectués pour déterminer la présence des protéines (GCF ou autre) qui se lient aux sites de liaison du facteur GCF. Dans nos expériences d'EMSA, nous avons constaté la présence de protéines dans les extraits nucléaires BOSC23 qui lient les sites putatifs de liaison du facteur GCF. Ces protéines n'ont pas été identifiées. Des essais *supershift* doivent être effectués pour voir si ces protéines incluent le

facteur GCF. Les essais de compétition avec deux différents compétiteurs, ont montré que la sonde non marquée, mutée dans les sites de liaison du GCF, ne peut pas faire la compétition avec la sonde marquée sauvage. Cela indique qu'il y a des protéines dans les extraits nucléaires, qui lient les motifs de liaison du facteur GCF de façon spécifique. Dans les essais d'EMSA effectués avec la sonde sauvage pour le site de liaison du facteur GCF, on a constaté une différence dans le profil de liaison protéine/sonde lorsque l'extrait nucléaire provenait des cellules non transfectées (voir résultat) par rapport au profil de liaison sonde/ protéine lorsque l'extrait provenait des cellules transfectées par le gène codant le facteur GCF (voir résultat). Cependant, les expériences d'EMSA, effectuées avec la sonde mutée dans les sites de liaison au facteur GCF utilisant les extraits nucléaires provenant des cellules transfectées ou non transfectées ne montrent pas de différence au niveau du profil de liaison protéine/sonde. Donc, il est possible que le GCF, se trouvant en grande concentration dans les extraits nucléaires des cellules transfectées, soit le facteur qui lie directement ces motifs de liaison, mais ne lie pas ces motifs lorsqu'ils sont mutés. Il a été démontré que le facteur GCF se trouve dans toutes les cellules, mais en très faible concentration [95]. Nos résultats pourraient confirmer la présence d'une quantité très faible du facteur GCF dans les cellules. Le facteur GCF endogène existant en très faible quantité n'interfère pas avec nos résultats de transfection effectuée avec les mutants de délétion décrits plus haut. Le mécanisme par lequel le GCF agit pour réprimer le promoteur PRIM1 n'est pas connu. Pour confirmer la liaison directe du facteur GCF au promoteur PRIM1, des essais *supershift* devraient être effectués utilisant des anticorps contre le facteur GCF (travail en progrès dans notre laboratoire).

Vu que le facteur GCF est un répresseur fort d'expression du gène PRIM1, il serait très intéressant de voir si l'induction de GCF peut reverser le phénotype des cellules transformées. Si cela se confirme, le GCF, livré par un vecteur viral par exemple, pourrait être utilisé pour inhiber la transcription du PRIM1 et ralentir le développement des tumeurs. Il sera également intéressant de vérifier si le phénotype oncogénique de certaines cellules qui surexpriment la PRIM1 (par exemple certaines

lignées cellulaires d'ostéosarcome) ou bien si le caractère tumorigénique des cellules qui expriment la protéine de fusion PRIM-NAC sera supprimé par le GCF.

Un de nos objectifs était de vérifier l'effet des procoagulants à activité mitogène sur le promoteur PRIM1. Il a été démontré que le FVIIa et la thrombine (composants de la voie de coagulation sanguine) aident à promouvoir la progression tumorale [106,122]. Ces composants induisent plusieurs effets au niveau des cellules. Un des effets cellulaires produit par ces composants est l'induction de l'activité mitogénique. Selon nos résultats, la thrombine, à une concentration de 0,1 U/ml, augmente l'activité du promoteur PRIM1. Le facteurVIIa est un autre procoagulant qui induit l'activité du promoteur PRIM1 en présence de son récepteur, le facteur tissulaire [48 et voir résultats]. Nos résultats, non présentés dans ce mémoire, démontrent que l'activation du promoteur PRIM1 produite par la thrombine est dépendante du récepteur PAR1, tandis que l'activation du promoteur générée par le FVIIa est dépendante des facteurs tissulaires et les récepteurs PAR2 [48]. Donc deux voies de signalisations distinctes sont impliquées dans l'induction d'activité du promoteur PRIM1 par les facteurs de coagulations. Il est intéressant de trouver l'élément qui répond au FVIIa dans le promoteur PRIM1. Le FVIIa et la thrombine pourraient être utilisés afin de stimuler la prolifération cellulaire dans certaines conditions médicales dont une croissance cellulaire est requise, par exemple la guérison des lésions traumatiques et les brûlures. Nous avons déjà certaines données préliminaires à ce sujet.

Nos résultats montrent que la thrombine et le FVIIa peuvent activer le promoteur PRIM1. Donc, il est possible que ces procoagulants aident la progression tumorale par l'augmentation d'expression du gène PRIM1. Cependant, l'effet de l'antithrombine III, à cause de son pouvoir d'antagoniser les facteurs impliqués dans la métastase et la croissance cellulaire (la thrombine, le FX et le FVIIa/facteur tissulaire), a été vérifié au niveau du promoteur du gène PRIM1. Nous avons constaté que l'antithrombine III humaine, à une concentration de 2,5 U/ml, inhibe l'expression du gène PRIM1 d'environ deux fois. L'inhibition d'expression du gène PRIM1 par

l'antithrombine III n'est pas très efficace dans notre système d'étude, car nous avons effectué nos travaux *in vitro* qui ne contient pas tous les éléments du système de coagulation et d'anticoagulation qui se trouvent *in vivo*. Par exemple, l'antithrombine III, seule, n'est pas un inhibiteur très efficace. Cependant, l'héparine présent à la surface des cellules endothéliales stimule l'activité de l'antithrombine III [107, 114]. Plusieurs protéines générées durant l'activation de la coagulation comme la thrombine, les facteurs IXa, Xa, et XIa sont inhibés par l'antithrombine III qui est un inhibiteur des sérines protéases [117, 132]. Il a été démontré que l'antithrombine III avec ou sans héparine réduit la quantité des facteurs VIIa liés aux facteurs tissulaires à la surface des cellules [103, 114, 118]. L'antithrombine III et les autres agents anticoagulants, pour leur pouvoir d'inhibiteur d'expression de la primase sont des agents intéressants pour le traitement du cancer et les maladies où l'ADN primase est surexprimée. Quelques études ont été effectuées sur l'effet anticancéreux des anticoagulants warfarine et héparine [117]. Cependant, les mécanismes par lesquels ces agents agissent pour inhiber la progression tumorale ne sont pas connus. D'après nos résultats, un des mécanismes par lequel l'antithrombine III exerce son effet antimétastatique et antitumoral pourrait être par l'inhibition d'expression du gène PRIM1. Même si ce dernier n'est pas le mécanisme principal de l'action antinéoplasique des anticoagulants, notre système promoteur PRIM1-gène rapporteur CAT peut nous servir comme outil dans les études sur les effets anticancéreux des anticoagulants et dans le criblage des molécules les plus prometteuses pour le traitement des cancers à l'aide des anticoagulants.

Afin de trouver l'élément qui répond à l'antithrombine III dans le promoteur du gène PRIM1, nous avons vérifié l'effet de l'antithrombine III sur nos différents mutants de délétions décrits précédemment. Selon nos résultats préliminaires, la diminution d'activité du promoteur PRIM1 par l'antithrombine III est conservée lorsque toutes les séquences en amont de la position -213 sont enlevées. Cependant, la délétion de la région se trouvant entre -213 et -152 supprime la diminution d'activité du promoteur PRIM1 produite en présence de l'antithrombine III. Donc, il est probable que la région située entre la position -213 et -152 contient les éléments

de réponse à l'antithrombine III. Cependant, il reste à trouver de façon plus précise ces éléments existant dans le promoteur du gène PRIM1, ainsi que les facteurs de transcription qui se lient à ces éléments de réponse (un facteur de transcription, le facteur Sp1, ayant un site de liaison dans cette région a été suggéré par le logiciel TESS). D'autre part, il sera intéressant de vérifier la suppression des métastases par l'antithrombine III dans un modèle animal.

Les inhibiteurs de l'ADN primase sont utiles non seulement pour étudier des différentes voies de signalisation biochimique, mais aussi pour développer des agents qui bloquent la prolifération cellulaire. Ces agents peuvent être utilisés comme des agents anticancéreux. La majorité des composants qui inhibent la primase sont des analogues de nucléotides. Les analogues de nucléotides ont certains désavantages : a) ils causent des dommages aux niveaux de l'ADN des cellules non cancéreuses; b) ils ne sont pas très efficaces dans les cas de surexpression de la protéine PRIM1, parce que les doses requises pour neutraliser la quantité augmentée de PRIM1 seront encore plus toxiques pour les cellules normales du patient. À cet égard, le ciblage du gène PRIM1 au niveau de sa transcription pourrait se traduire dans des nouvelles approches pour le traitement du cancer.

CONCLUSION

Nos études d'identification des séquences promotrices PRIM1 impliquées dans la régulation d'expression du gène PRIM1 ont permis de conclure que le promoteur PRIM1 n'a pas de boîte TATA. Cependant, à l'aide de plusieurs mutants de délétions, nous avons identifié des séquences importantes pour l'activité du promoteur du gène PRIM1. Ces séquences sont situées en aval de la position -152 du promoteur du gène PRIM1. Ces séquences, étant riches en GC, pourraient jouer un rôle important dans la transcription basale du gène PRIM1. Les recherches informatiques de facteur de transcription ont révélé la présence des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 (-150 à -145, -82 à -77, -31 à -24 et +7 à +12) et E2F-1 (+5 à +12). De plus, nos recherches de mécanismes d'inhibition de l'activité du promoteur PRIM1 nous ont mené à identifier le facteur GCF comme un répresseur de l'activité du promoteur PRIM1. Nos études ont démontré que le facteur GCF réprime le promoteur PRIM1 via ses deux sites de liaison (-17 à -11 et -6 à +4), proposés par la recherche TESS. Cependant, pour confirmer la liaison du facteur GCF à ces sites, d'autres expériences doivent être effectuées (essais *supershift* et *footprint*).

L'étude de l'effet de la thrombine et le FVIIa (facteurs à activité mitogène) a démontré que ces procoagulants augmentent l'activité du promoteur PRIM1. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour identifier les voies de signalisation empruntées par ces procoagulants pour activer l'expression du gène PRIM1. Enfin, nos études ont démontré que l'antithrombine III, étant un anticoagulant, inhibe l'expression du gène PRIM1. Les mécanismes par lesquels l'antithrombine III agit pour inhiber l'expression du gène PRIM1 ne sont pas connus.

Ces études nous ont permis de développer un système simple pour étudier la régulation d'expression du gène PRIM1 et identifier des facteurs connus ou nouveaux qui sont des inhibiteurs de l'activité du promoteur PRIM1. Ces agents peuvent servir pour traiter les cancers et les maladies reliées à une surexpression de l'ADN primase.

RÉFÉRENCES

1. Hartwell LH, Culotti J, Pringle J, and Reid B. Genetic control of cell division in yeast. *Science*, 183 : 46-51, 1974.
2. Siminovitch L, and Thompson LH. The nature of conditionally lethal temperature-sensitive mutations in somatic cells. *J Cell Physiol*, 95 : 361-366, 1978.
3. Wahl AF, Geis AM, Spain BH, Wong SW, Korn D, and Wang TSF. Gene expression of human DNA polymerase α during cell proliferation and the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 8 : 5016-5025, 1988.
4. Myazawa H, Izumi M, Tada S, Takada R, Masutani M, Ui M, and Hanaoka F. Molecular cloning of the cDNAs for the four subunits of mouse DNA polymerase α -primase complex and their gene expression during cell proliferation and the cell cycle. *J Biol Chem*, 268 : 8111-8122, 1993.
5. Yotov WV, Hamel H, Rivard GE, Champagne MA, Russo PA, Leclerc JM, Bernstein ML, and Levy E. Amplification of DNA primase 1 (PRIM1) in Human Osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 26 : 62-69, 1999.
6. Israels ED, and Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells*, 19 : 88-91, 2001.
7. Johnson LF. G1 events and the regulation of genes for S-phase enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, 4 : 149-154, 1992.
8. Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, and Tijan R. Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF 110 reveal properties expected of coactivators. *Cell*, 72 : 247-260, 1993.

9. Zetterberg A, Larsson O, and Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*, 7 : 835-842, 1995.
10. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71 : 1286-1290, 1974.
11. Melton DW, Konecki DS, Brennan J, and Caskey CT. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phospho-ribosyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 : 2147-2151.
12. Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL, and Luskey KL. HMG CoA reductase : a negatively regulated gene with usual promotor and 5'untranslated regions. *Cell*, 38 : 275-285, 1984.
13. De Gregori J, Kowalic T, and Nevins JR. Cellular targets for activation by E2F1 transcription factor include DNA synthesis-and G1/S- regulatory genes. *Mol Cell Biol*, 15 : 4215-4224, 1995.
14. Leone G, De Gregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, and Nevins JR. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*, 12 : 2120-2130, 1998.
15. Muller H, Moroni MC, Vigo E, Peterson BO, Bartek J, and Helin K. Induction of S-phase entry by E2F transcription factor depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 17 : 5508-5520, 1997.
16. Nevins JR, Leone G, De Gregori J, and Jakoi L. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*, 173 : 233-236, 1997.

17. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, and Bartek j. Retinoblastoma-protein-dependent cell cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375 : 503-506, 1995.
18. Suzuki-Takahashi I, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, and Okuyama A. The interactions of E2F with pRb and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRb and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene*, 10 : 1691-1698, 1995.
19. Reiter T, Fett R, and Knippers R. Cell-cycle-dependant expression of DNA primase activity. *Eur J Biochem*, 164 : 59-63, 1987.
20. Tseng BY, Prussak CE, and Almazan MT. Primase p49 mRNA expression is serum stimulated but does not vary with the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 9 : 1940-1945, 1989.
21. Foiani M, Santocanale C, Plevani P, and Lucchini G. A single essential gene, PRI2, encodes the large subunit of DNA primase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 9 : 3081-3087, 1989.
22. Johnston LH, White JHM, Johnson AL, Lucchini G, and Plevani P. The yeast DNA polymerase I transcript is regulated in both the mitotic cell cycle and in meiosis and is also induced after DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 15 : 5017-5030, 1987.
23. Johnston LH, White JHM, Johnson AL, Lucchini G, and Plevani P. Expression of the yeast DNA primase gene, PRI1, is regulated within the mitotic cell cycle and in meiosis. *Mol Gen Genet*, 221 : 44-48, 1990.

24. Nasheuer HP, Moore A, Wahl AF, and Wang TSF. Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem*, 266 : 7893-7903, 1991.
25. Voitenleitner C, Rehfuess C, Hilmes M, O'Rear L, Liao PC, Gage DA, Ott R, Nasheuer HP, and Fanning E. Cell cycle-dependent regulation of human DNA polymerase α -primase activity by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 19 : 646-656, 1999.
26. Moore AL, and Wang TSF. Down-regulation of gene encoding DNA replication proteins during cell cycle exit. *Cell Growth Differentiation*, 5 : 485-494, 1994.
27. Vishwanatha JK, Coughlin SA, Wesolowski-Owen M, and Baril EF. A multiprotein form of DNA polymerase α from HeLa cells. Resolution of its associated catalytic activities. *J Biol Chem*, 261 : 6619-6628, 1986.
28. Bensch KG, Jenkins MD, Hu SZ, Wang S-F, and Korn D. Intracellular localization of human DNA polymerase α with monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, 257 : 8391-8396, 1982.
29. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood*, 71 : 1-8, 1988.
30. Pizzagalli A, Valsasnini P, Plevani P, and Lucchini G. DNA polymerase I gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, mapping of a temperature-sensitive mutation, and protein homology with other DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 3772-3776, 1988.

31. Wong SW, Wahl AF, Yuan PM, Arai N, Pearson BE, Arai K, Korn D, Hunkapiller MW, and Wang TSF. Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J*, 7 : 37-47, 1988.
32. Ferrari M, Lucchini G, Plevani P, and Foiani M. Phosphorylation of the DNA polymerase alpha-primase B subunit is dependent on its association with the p180 polypeptide. *J Biol Chem*, 271 : 8661-8666, 1996.
33. Arezi B and Kuchta RD. Eucaryotic DNA primase. *Trends Biochem Sci*, 25 : 572-576, 2000.
34. Mizuno T, Ito N, Yokoi M, Mobayashi A, Tamai K, Miyazawa H, and Hanaoka F. The second-largest subunit of the mouse both production and nuclear translocation of the catalytic subunit of DNA polymerase α . *Mol Cell Biol*, 18 : 3552-3562, 1998.
35. Copeland WC and Wang TSF. Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of DNA replication. *J Biol Chem*, 268 : 26179-26189, 1993.
36. Mizuno T, Okamoto T, Yokoi M, Izumi M, Kobayashi A, Hachiya T, Tamai K, Inoue T, and Hanaoka F. Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase : nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *J Cell Science*, 109 : 2627-2636, 1996.
37. Collins KL, Russo AA, Tseng BY, and Kelly TJ. The role of the 70-kDa subunit of human DNA polymerase α in DNA replication. *EMBO J*, 12 : 4555-4566, 1993.

38. Santocanale C, Foiani M, Lucchini G, and Plevani P. The isolated 48,000- dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis. *J Biol Chem*, 268; 1343-1348, 1993.
39. Copeland WC. Expression, purification, and characterization of the two human primase subunits and truncated complexes from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 9 : 1-9, 1997.
40. Kornberg A, and Baker T. *DNA replication*, WH Freeman, New York, 1992.
41. Holm L, and Sander C. DNA polymerase β belongs to an ancient nucleotidyl transferase superfamily. *Trends Biochem Sci*, 20 : 345-347, 1995.
42. Copeland WC, and Tan X. Active site mapping of the catalytic mouse primase subunit by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 270 : 3905-3913, 1995.
43. Cloutier S, Hamel H, Champagne M, and Yotov WV. Mapping of the human DNA primase 1 (PRIM1) to chromosome 12q13. *Genomics*, 43 : 398-401, 1997.
44. Shiratori A, Okumura K, Nogami M, Tagushi H, Onozaki T, Inoue T, Ando T, Shibata T, Izumi M, and Miyazawa H. Assignment of the 49-kDa (PRIM1) and 58-kDa (PRIM2A and PRIM2B) subunit genes of the human DNA primase to chromosome bands 1q44 and 6p11.1-p12. *Genomics*, 28 : 350-353, 1995.
45. Lucchini G, Francesconi S, Foiani M, Badaracco G, and Plevani P. Yeast DNA polymerase-DNA primase complex; cloning of PRI1, a single essential gene related to DNA primase activity. *EMBO J*, 6 : 737-742, 1987.

46. Singh H, and Dumas LB. A DNA primase that copurifies with the major DNA polymerase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 259 : 7936-7940, 1984.
47. Plevani P, Badaracco G, Augl C, and Chang LMS. DNA polymerase I and DNA primase complex in yeast. *J Biol Chem*, 259 : 7532-7539, 1984.
48. Yotov VW, Esmailzadeh L, Bernstein ML, Guerassimov A, and Rivard GE. Factor VIIa-mediated action on the DNA primase 1 promotor. (Manuscript submitted)
49. Prussak CE, Almazan Mt, and Tseng BY. Mouse primase p49 subunit molecular cloning indicates conserved and divergent regions. *J Biol Chem*, 264 : 4957-4963, 1989a.
50. Brooke RG, Singhal R, Hinkle DC, and Dumas LB. Purification and characterization of the 180 and 86 kilodalton subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA primase-DNA polymerase protein complex. The 180 kilodalton subunit has both DNA polymerase and 3'→5'-exonuclease activities. *J. Biol. Chem*, 266 : 3005-3015, 1991.
51. Damagnez V, Tillit J, de Recondo AM, and Baldacci G. The POL1 gene from the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, shows conserved amino acid blocks specific for eukaryotic DNA polymerases α . *Mol Gen Genet*, 266 : 182-189, 1991.
52. Hirose F, Yamaguchi M, Nishida Y, Masutani M, Miazawa H, Hanaoka F, and Matsukage A. Structure and expression during development of *Drosophila melanogaster* gene for DNA polymerase α . *Nucleic Acids Res*, 19 : 4991-4998, 1991.

53. Cotterill S, Lehman IR, and McLachlan P. Cloning of the gene for the 73 kD subunit of the DNA polymerase α primase of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*, 20 : 4325-4330, 1992.
54. Melov S, Vaughan H, and Cotterill S. J. Molecular characterisation of the gene for the 180 kDa subunit of the DNA polymerase-primase of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Science*, 102 : 847-856, 1992.
55. Collins KL, Russo AA, Tseng BY, and Kelly TJ. The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase α in DNA replication. *EMBO J*, 12 : 4555-4566, 1993.
56. Miyazawa H, Izumi M, Tada S, Takada R, Masutani M, Ui M, and Hanaoka F. Molecular cloning of the cDNAs for the four subunits of mouse DNA polymerase α -primase complex and their gene expression during cell proliferation and the cell cycle. *J Biol Chem*, 268 : 8111-8122, 1993.
57. Stadlbauer P, Brueckner A, Rehfuess C, Eckerskorn C, Lottspeich F, Frster V, Tseng BY, and Nasheuer HP. DNA replication in vitro by recombinant DNA-polymerase α -primase. *Eur J Biochem.*, 222 : 781-793, 1994.
58. Schneider A, Smith RW, Kautz AR, Weisshart K, Grosse F, and Nasheuer HP. Primase activity of human DNA polymerase α -primase. Divalent cations stabilize the enzyme activity of the p48 subunit. *J Biol Chem*, 273 : 21608-21615, 1998.
59. Watson JD, and Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*; 171 : 737-738, 1953.
60. Thommes P, and Hubscher U. Eucaryotic DNA replication, enzyme and proteins acting at the fork. *Eur J Biochem*, 194 : 699-712, 1990.

61. Ogawa T, and Okazaki T. Discontinuous DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 49 : 421-457, 1980.
62. Kaguni LS, and Lehman IR. Eukaryotic DNA polymerase-primase: structure, mechanism and function. *Biochem Biophys Acta*, 950 : 87-101, 1988.
63. Lehman IR, and Kaguni LS. DNA polymerase α . *J Biol Chem*, 264 : 4591-4595, 1989.
64. Étienne J. *Biochimie génétique/Biologie moléculaire*, troisième édition, Masson, Paris, 1996.
65. Conaway RC, and Lehman IRA. ADN primase activity associated with ADN polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos. *Proc Natl Acad Sci*, 79 : 2523-2527, 1982.
66. So AG, and Downey KM. Mammalian DNA polymerases α and delta: current status in DNA replication. *Biochemistry*, 27 : 4591-4595, 1988.
67. Bambara RA, Myers TW, and Sabatino RD. In the eucaryotic nucleus : molecular biochemistry and macromolecular assemblies (Strauss P, Wilson SH, eds). Telford Press, Caldwell, NJ : 69-94, 1990.
68. Plevani P, Foiani M, Falconi M, Pizzagalli A, Santocanale C, Francesconi S, Valsasnini P, Comedini A, Piatti S, and Lucchini G. The yeast DNA polymerase-primase complex : gene and proteins. *Biochim Biophys Acta*, 951 : 268-273, 1988.
69. Suzuki M, Savoysky E, Izuta S, Tatebe M, Okajima T, and Yoshida S. RNA priming coupled with ADN synthesis on natural template by calf thymus ADN polymerase α - primase. *Biochemistry*, 32 : 12782-12792, 1993.

70. Kuchta RD, Reid B, and Chang LMS. ADN primase. Processivity and the primase to polymerase α activity switch. *J. Biol. Chem*, 265: 16158-16165, 1990.
71. Waga S, and Stillman B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*, 369: 207-212, 1994.
72. Wintersberger U. Ribonucleases H of retroviral and cellular origin. *Pharmacol Ther*, 48(2) : 259-280, 1990.
73. Holmes AM, Cheriathundam E, Bollum FJ, and Chang LMS. Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *J Biol Chem*, 260 : 10840-10846, 1985.
74. Parker WB, and Cheng Y-C. Inhibition of DNA primase by nucleoside triphosphates and their arabinofuranosyl analogs. *Mol Pharmacol*, 31 : 146-151, 1987.
75. Shioda M, Nelson EM, Bayne ML, and Benbow RM. ADN primase activity associated with ADN polymerase α from *Xenopus laevis* ovaries. *Proc Natl Acad Sci*, 79 : 7209-7213, 1982.
76. Coughlin SR. Sol Sherry lecture in thrombosis : how thrombine talks to cells : molecular mechanisms and roles in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18 : 514-518, 1998.
77. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, and Darnell. *Biologie moléculaire de la cellule*. Troisième édition, 1997.
78. Frick ND, and Richardson CC. DNA primases. *Annu Rev Biochem*, 70 : 39-80, 2001.

79. Yagura T, Kozo T, and Seno T. Mouse DNA replicase. DNA polymerase associated with a novel RNA polymerase activity to synthesize initiator RNA of strict size. *J Biol Chem*, 257 : 11121-11127, 1982.
80. Yotov WV, Esmailzadeh L, Levy E, Moghrabi A, Benstein ML, and Rivard GE. PRIM-NAC fusion protein in leukemia (Manuscript submitted) .
81. Janet P, Reidemann HJ, and Scherer SD. Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements. *Cell Biology International*, 25 : 17-31, 2001.
82. Nishikawa N, Izumi M, Yokoi M, Miyazawa H, and Hanaoka F. E2F regulates growth-dependant transcription of genes encoding both catalytic and regulatory subunits of mouse primase. *Genes to Cells*, 6 : 57-70, 2001.
83. Nishikawa NS. Cloning and characterization of the 5'-upstream sequence governing the cell cycle dependant transcription of mouse DNA polymerase α 68 kDa subunit gene. *Nucleic Acids Res*, 28 : 1525-1534, 2000.
84. Morrione A, DeAngelis T, and Baserga R. The GC factor regulates the expression of the insulin-like growth factor-I receptor. *Cell Prolif*, 28 : 659-671, 1995.
85. Akiyama S, Endo H, Inohara N, Ohta S, and Kagawa Y. Gene structure and cell type-specific expression of the human ATP synthase α subunit. *Biochim Biophys Acta*, 1219 : 129-140, 1994.
86. Chang LS, Zhao L, Zhu L, Chen ML, and Lee MY. Structure of the gene for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta (POLD1). *Genomics*, 28 : 411-419, 1995.

87. Greco A, Villa R, and Pierotti MA. Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene*, 13 : 2463-2466, 1996.
88. Hauser F, Meyerhof W, Wulfsen I, Schonrock C, and Richter D. Sequence analysis of the promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 1 gene. *FEBS Lett*, 345 : 225-228, 1994.
89. Itoh F, Ishizaka Y, Tahira T, Yamamoto M, Miya A, Imai K, Yachi A, Takai S, Sugimura T, and Nagao M. Identification and analysis of the ret proto-oncogene promoter region in neuroblastoma cell lines and medullary thyroid carcinomas from MEN2A patients. *Oncogene*, 7 : 1201-1206, 1992.
90. De Arrieta CM, Jurado P, Bernal J, and Coloma A. Structure, organization, and chromosomal mapping of the human neurogranin gene (NRGN). *Genomics*, 41 : 243-249, 1997.
91. Saito H, Kouhara H, Kasayama S, Kishimoto T, and Sato B. Characterization of the promoter region of the murine fibroblast growth factor receptor 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 183 : 688-693, 1992.
92. White MR, and Hung MC. Cloning and characterization of the mouse neu promoter. *Oncogene*, 7 : 677-683, 1992.
93. Kitadai Y, Yamazaki H, Yasui W, Kyo E, Yokozaki H, Kajiyama G, Johnson AC, Pastan Ira, and Tahara E. GC factor represses transcription of several growth factor/receptor genes and causes growth inhibition of human gastric carcinoma cell lines. *Cell Growth Differ*, 4 : 291-296, 1993.

94. Takimoto M, mao P, Wei G, Yamazaki H, miura T, Johnson AC, and Kuzumaki N. Molecular analysis of the GCF gene identifies revisions to the cDNA and amino acid sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1447 : 125-131, 1999.
95. Beguinot L, Yamazaki H, Pastan I, and Johnson AC. Biochemical characterization of human GCF transcription factor in tumor cells. *Cell Growth Differentiation*, 6 : 699-706, 1995.
96. Ishii S, Xu Y-H, Stratton RT, Reo BA, Merlino GT, and Pastan I. Characterization and sequence of the promotor region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 : 4920-4924, 1985.
97. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, and Baltimore D. Production of high-titer helper-free retrovirus by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 : 8392-8396, 1993.
98. Ausubel L, Frederick M. *Current protocols in Molecular Biology*. New York, Toronto, 1988.
99. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principales of protein dye-ligand. *Anal Biochem*, 12 : 248-254, 1976.
100. Chiu R, Angel P, and Karin M. Jun B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of c-jun. *Cell*, 59 : 979-976, 1989.
101. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manuel*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989.

102. Rapaport SI, and Rao LVM. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemostasis*, 74 : 7-17,1995.
103. Lawson JH, Butenas S, Ribarik N, and Mann KG. Complex-dependant inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J Biol Chem*, 268 : 767-770, 1993.
104. Kageyama R, and Pastan I. Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. *Cell*, 59 : 815-825, 1989.
105. Goldstein A. *Biostatistics an introductory press*. New York, 1964.
106. Bromberg MB, and Cappello M. Cancer and blood coagulation : molecular aspects. *Cancer J Sci Am*, 5 : 132-138, 1999.
107. Björn Dahlbäck. Blood coagulation. *Lancet*, 355 : 1627-32, 2000.
108. Furie, Bruce MD, and Furie, and Barbara MD. Biology of blood coagulation. *N Eng J Med*, 326 : 800-806, 1992.
109. Davie EW, Fujikawa K, and Kisiel W. The coagulation cascade : Initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30 : 10363-10370, 1991.
110. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Khan ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, and Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in human. *Nature*, 386 : 502-506, 1997.
111. Xu WF, Andersen H, Whitmore TF, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, and Foster DC. Cloning and characterization of human protease activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 95 : 6642-6646, 1998.

112. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, and Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 349 : 690-694, 1998.
113. Vu TKH, Hung DT, Wheaton VI, and Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 : 1057-1068, 1991.
114. Rao LVM, Rapaport SI, and Hoang AD. Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa. *Blood*, 81 : 2600-2607, 1993.
115. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 11023-11027, 1999.
116. Nierodzik ML, Chen K, Takeshita K, Li JJ, Huang YQ, Feng XS, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, and Karpatkin S. Protease-activated receptor-1 (PAR-1) is required and rate limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood*, 92 : 3694-3700, 1998.
117. Lindahl U, and Kjellen L. Heparin and heparan sulfate-what is the difference? *Thromb Haemost*, 66 : 44-48, 1991.
118. Shigemats Y, Myata T, Higashi S, Miki T, Sadler JE, and Iwanaga S. Expression of human soluble tissue factor in yeast and enzymatic properties of its complex with factor VIIa. *J Biol Chem*, 267 : 21329, 1992.
119. Doll R, and Peto R. The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 66 : 1191-1308, 1981.

120. Esumi N, Fan D, and Fidler IJ. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant disulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res*, 51 : 4549-4556, 1991.
121. Johnson MJ. Problems of anticoagulation within a palliative care setting : an audit of hospice patients taking warfarin. *Palliat Med*, 11 : 306-312, 1997.
122. Rao LVM. Tissue factor as tumor procoagulant. *Cancer Metastasis Rev*, 11 : 249-266, 1992.
123. Callander NS, Varki N, and Rao LVM. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer*, 70 : 1194-1201, 1992.
124. Mueller BM, and Reisfield RA, Edginton Tet al. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 : 11832-11836, 1992.
125. Hu T, Bach RR, and Horton R, Konigsberg WH, and Todd MB. Procoagulant activity in cancer cells is dependant on tissue factor expression. *Oncology Res*, 6 : 321-327, 1994.
126. Bromberg ME, Konigsberg WH, and Madison JF, Pawashe A, and Garen A. Tissue factor promotes metastasis by a pathway independant of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 : 8205-8209, 1995.
127. Shigemori C, Wada H, and Matsumoto K, Shiku H, Nakamura S, and Suzuki H. Tissue factor expression and metastasis potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 80 : 894-898, 1998.

128. Orlander JV, Bremer ME, and Marasa JC, and Feder J. Fibrin-enhanced endothelial cell organization. *J Cell Physiol*, 125 : 1-9,1985.

129. Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost*, 74 : 1-6, 1995.

130. Zacharski LR, Dunwiddie C, Nutt EM, Hunt J, and Memoli VA. Cellular localization of activated factor X by Xa specific probes. *Thromb Haemost*, 65 : 545-548, 1991.

131. Nierodzik MLR, Kajumo F, and Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res*, 52 : 3267-3272, 1992.

132. Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, and Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surface. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood*, 85 : 121-129, 1995.