

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
BIDÉNAM KAKOU**

**HÉTÉROGÉNÉITÉ DE L'ESPACEUR INTERGÉNIQUE ET CROISSANCE
CHEZ LA PERCHAUDÉ (*PERCA FLAVESCENS*)**

OCTOBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Les multiples copies de familles de gènes d'ARN ribosomiaux (ARNr) sont séparées par des régions non transcrites appelées espaceurs intergéniques (IGSs). L'IGS renferme les séquences régulatrices de la transcription des gènes d'ARNr parmi lesquelles se trouvent des éléments répétitifs, notamment des "enhancers" qui augmentent le taux de transcription des gènes d'ARNr. La variation du nombre de ces répétitions est à l'origine de l'hétérogénéité de longueur des IGS retrouvée entre individus. Plusieurs études ont établi une corrélation entre cette hétérogénéité et le taux de croissance en démontrant que le taux de croissance varie proportionnellement à la longueur des IGS. L'objectif principal de mon étude est de développer un marqueur moléculaire permettant d'évaluer l'hétérogénéité de l'IGS chez la perchaude (*Perca flavescens*). Pour ce faire, l'IGS d'un individu de perchaude a été amplifié par PCR, séquencé puis reconstitué. La structure de cet IGS révèle la présence de quatre régions contenant des répétitions en tandem (régions répétitives). Afin de déterminer l'implication de ces régions dans la variation de longueur des IGS, des amplifications PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces flanquant les régions répétitives. Parmi ces tests, seule l'amplification du segment d'IGS contenant les deux premières régions répétitives à partir du 28S révèle une hétérogénéité de longueur des IGS chez les perchaudes. Par conséquent, la paire d'amorce flanquant ce segment a été choisie comme marqueur pour déterminer les génotypes d'IGS dans des populations de perchaudes des rives nord et sud du Lac St-Pierre (LSP). Ainsi, trois principaux génotypes ont émergés : les génotypes "Long" (L), "Court" (S), et "Long & Court" (LS). Le second objectif de l'étude est d'évaluer l'impact des longueurs d'IGS sur la croissance. Ainsi, les taux de croissance des perchaudes ont été déterminés à l'aide de deux indices de croissance, soit la longueur totale (TL) et le rapport ARN/ADN. Les résultats montrent que ce dernier est similaire entre les deux populations, par contre, la TL moyenne est plus élevée sur la rive sud. Les résultats montrent également une distribution des génotypes similaire entre les deux populations; par conséquent, chez la perchaude du LSP, la variation des longueurs d'IGS ne semble pas influencer leur taux de croissance. Néanmoins, cette étude a permis d'obtenir le premier marqueur moléculaire permettant de révéler l'hétérogénéité de longueur des IGS chez la perchaude en plus de fournir de nouvelles données sur la structure de l'IGS de perchaude.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce mémoire est divisé en trois parties : le chapitre I est une revue de littérature qui traite d'abord du rôle de l'ADN ribosomal (ADNr) dans la croissance; suivi d'une description de la perchaude du Lac St-Pierre puis des hypothèses et objectifs de mon étude. Le chapitre II est l'article scientifique qui sera soumis au journal scientifique *Génome-Presses scientifiques du CNRC*. Finalement, le chapitre III est une discussion et conclusion détaillées des résultats. Mes remerciements vont d'abord à ma directrice de recherche Hélène Glémet qui m'a encadrée et énormément soutenue tout au long de ces années de recherche. Je tiens également à remercier tous les professeurs des laboratoires qui m'ont aimablement laissée utiliser certains de leur matériel de laboratoire.

Je remercie également ma famille et mes amis.

Mots clés : Espaceur intergénique, ADN ribosomal, transcription, ribosomes, perchaude, Lac St-Pierre, indice de croissance.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1. Revue de littérature.....	2
1.1 Le ribosome : Composition et fonction.....	2
1.2 Les gènes d'ARNr.....	3
1.3 L'espaceur intergénique (IGS).....	5
1.4 Gènes d'ARNr et croissance.....	8
1.5 Mécanismes de régulation de la transcription des gènes d'ARNr.....	9
1.5.1 Mécanismes épigénétiques.....	11
1.5.2 Hétérogénéité de longueur des IGS.....	14
1.6 Signification écologique de l'hétérogénéité de longueur des IGS : L'hypothèse du taux de croissance «Growth Rate Hypothesis» (GRH)	16
1.7 Le lac St-Pierre.....	17
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	18
CHAPITRE II RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER VARIATION IN YELLOW PERCH, PERCA FLAVESCENS AND ITS PROBABLE LINK TO GROWTH RATE.....	20
Abstract.....	22
Résumé.....	23
Introduction.....	24
Materials and methods.....	26
Results and discussion.....	30
Acknowledgements.....	35
References... ..	36
Figure captions.....	41
CHAPITRE III DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	45

<i>Structure de l'IGS</i>	46
<i>Taux de croissance et importance fonctionnelle du polymorphisme de longueur d'IGS</i>	51
BIBLIOGRAPHIE	56

LISTE DES FIGURES

1.1	Le ribosome et ses ARNr.	3
1.2	Familles des gènes codant pour les ARNr 18S, 5.8S et 28S. Ces gènes sont transcrits en un précurseur d'ARN contenant les ITS1, ITS2 ainsi que le 5'ETS et le 3'ETS.....	4
1.3	L'espaceur intergénique (IGS) est localisé entre les familles de gènes d'ARNr et contient les séquences d'ADN qui régulent la transcription des gènes d'ARNr.....	5
1.4	Éléments régulateurs de l'IGS. Le promoteur central (CORE); le site d'initiation de la transcription (<i>tis</i>), l'« upstream control element » (UCE), le « proximal terminator (PT) », les « enhancers », les « spacer promoter » (SP) et les « terminators » (term) (Paule, 1998)	6
1.5	Contrôle épigénétique des gènes d'ARNr par des mécanismes de déméthylation, méthylation, acétylation et déacétylation (Preuss & Pikaard, 2007)	14
2.1	General IGS structure for <i>Perca flavescens</i> . The IGS is the region between the 28S and 18S rRNAs. Repetitive regions R1, R2, R3, R4 found in the IGS are displayed in white boxes. Primers RIGS and FIGS were used for IGS amplification. Primers P1 and P2 for PCR amplification in order to identify IGS length heterogeneity in yellow perch populations.....	43
2.2	Banding patterns revealed by the PCR amplification of R1 + R2 region. Genotypes «Long» represented by a single 2.5 kb band, «Long and Short» represented by a 2.5 kb and 1.5 kb double band, «Short» constituted by a single band of 1.5 kb. M is the ladder.....	43

- 2.3** Frequency of individuals carrying the long , short and "long and short" genotypes in the north shore population and the south shore population of yellow perch, from Lake St Pierre. Pearson Chi-square ($p=0.832$).....44
- 2.4** RNA/DNA ratios (mean \pm s.e.) for north (NS) and south shore (SS) yellow perch, *Perca flavescens* populations from Lake St. Pierre. One-way anova (weight covariable) ($p=0.413$).....44
- 2.5** Total lengths (mean \pm s.e.) for the north (NS) and south shore (SS) yellow perch *Perca flavescens* populations from Lake St. Pierre. T test (* indicates significative difference, $p=0.003$).....45

LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ADNr	ADN ribosomal
C:N:P	carbone:azote:phosphore
CORE promotor	promoteur central
ETS	"External Transcribed Spacer "
GRH	"Growth Rate Hypothesis"
H	histone
HATs	histones acétylases
HDACs	histones déacétylases
IGS	espaceur intergénique
ITS	"Internal Transcribed Spacer"
Kb	Kilobase
L	long
LS	"long and short" ou long et court
LT	Longueur Totale
N	azote
NoRC	"Nucleolar Remodeling complex"
NS	"north shore"

nt	nucléotide
P	amorce ou "primer"
P	phosphore
Pb	paire de base
Pol I	ARN polymerase I
Poly (Da)	homopolymère de la base A
Poly (dt)	homopolymère de la base T
Pre-ARNr	précurseur d'ARNr
PT	"Proximal Terminator"
S	"short" /court
SB	Southern blot hybridization
SP	"Spacer Promotor"
SS	"south shore"
Term	"terminator"
TL	"Total Length"
Tis	"transcription initiation site"
UCE	"Upstream Control Element"
UPE	"Upstream Promotor element"

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Revue de littérature

1.1 Le ribosome : Composition et fonction

Le ribosome est le site de synthèse des protéines chez tous les organismes; il est constitué d'une grosse et d'une petite sous-unités formées de protéines associées à des ARN ribosomiaux (ARNr). Chez les eucaryotes supérieurs, la grosse sous-unité comprend les ARNr 28S, 5.8S, 5S et la petite sous-unité l'ARNr 18S (Figure 1.1).

La traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines requiert l'intervention coordonnée d'une machinerie de synthèse composée de ribosomes, d'ARN de transferts (ARNt), d'ARN messagers (ARNm) et de plusieurs protéines. Chaque ARNt contient une séquence de trois nucléotides, l'anticodon, complémentaire à un codon de l'ARNm. L'anticodon et le codon se lient, permettant ainsi à l'ARNt d'apporter l'acide aminé auquel il est associé et de l'intégrer à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. La traduction débute par l'assemblage du premier ARNt (ARNt^{Met}) et de l'ARNm sur la petite sous-unité du ribosome; ce complexe d'initiation ainsi formé se lie ensuite à la grosse sous-unité du ribosome (Lodish *et al.* 2003). Le processus d'élongation qui suit est caractérisé par la succession d'ARNt au niveau de sites précis du ribosome (sites A et P); chaque ARNt apportant un nouvel acide aminé qui sera incorporé à la chaîne polypeptidique naissante par la formation d'un lien peptidique entre cet acide aminé et le polypeptide. La traduction prend fin lorsqu'un ARNt intègre un codon stop; ce qui aboutit, à la libération de la protéine nouvellement synthétisée et à la dissociation du complexe d'initiation.

Plusieurs ribosomes aidés par des protéines appelées facteurs de transcription effectuent la traduction en se déplaçant le long de l'ARNm de son extrémité 5' à son extrémité 3'. Le ribosome sert donc de site à l'intérieur duquel tous les éléments participant à la traduction se regroupent pour effectuer la synthèse des protéines. Le ribosome ne joue pas seulement un rôle d'usine de fabrication des protéines, il y

participe activement via le rôle des ses ARN. En effet, au cours du processus d'élongation la formation du lien peptidique est catalysée principalement par l'ARNr 28S (Noller *et al.* 1992); les protéines ribosomales assurant le reste de l'activité catalytique du ribosome (Diedrich *et al.* 2000; Ramakrishnan & White, 1998; Rodnina *et al.* 2006; Khaitovich *et al.* 1999). De plus, tous les ARNr interagissent avec l'ARNm au cours de la traduction excepté l'ARNr 5S qui ne joue qu'un rôle accessoire.

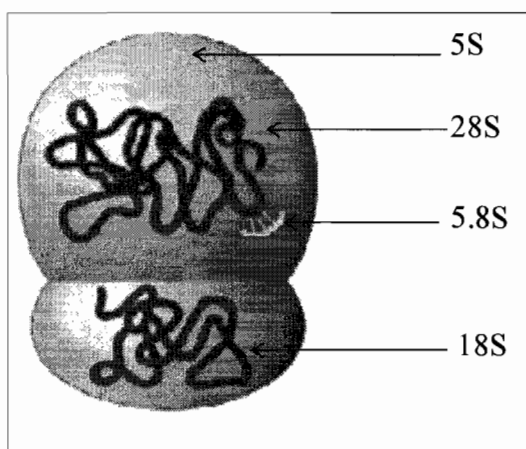


FIGURE 1.1 : Le ribosome et ses ARNr. La grosse sous-unité du ribosome contient les ARNr 5S, 28S et 5.8S. La petite sous-unité ne possède que l'ARNr 18S.

1.2 Les gènes d'ARNr

L'ADN ribosomal (ADNr) regroupe les gènes codant pour les ARNr. Ces gènes sont organisés en familles répétées en tandem existant en 100 copies ou plus dans le génome des eucaryotes (Lodish *et al.* 2003). Une famille comprend les gènes d'ARNr 18S, 5.8S et 28S séparés par les « internal transcribed spacer » 1 et 2 (ITS1 et ITS2) (Figure 1.2). Ces familles sont localisées sur un ou plusieurs chromosomes au niveau de sites appelés organisateurs nucléolaires autour desquels se forme le nucléole. Ce dernier est le compartiment nucléaire dans lequel s'effectue la transcription des ARNr et l'assemblage des ribosomes (Moss, 2004; Nomura, 2001).

Les gènes 28S, 5.8S et 18S sont transcrits par l'ARN polymérase I (pol I) en un seul large précurseur (le pre-ARNr); contenant à son extrémité 5' proche du 18S le « 5' external transcribed spacer » (5' ETS) et à son extrémité 3' proche du 28S le « 3' external transcribed spacer » (3' ETS) proche du 28S (Figure 1.2). Ce précurseur subit par la suite une maturation pour donner ces trois ARNr. L'ARNr 5S est transcrit à l'extérieur du nucléole par l'ARN polymérase III tandis que les gènes codant pour les protéines ribosomales sont transcrits par l'ARN polymérase II.

Par ailleurs, la séquence nucléotidique des gènes d'ARNr est très conservée aussi bien à l'intérieur d'une même espèce qu'entre les espèces. Les organismes ont donc préservé une remarquable similitude au niveau des séquences de la famille de gènes d'ARNr tout au long de l'évolution. Une telle homogénéité de séquence intra et interspécifique connue sous le nom d'évolution concertée (Schlotterer & Tautz, 1994) résulte de processus tels que les crossing-over inégaux, l'amplification de gènes et la conversion génique; ce dernier étant le facteur le plus influant dans ce processus d'homogénéisation des gènes d'ARNr (Dover, 1982; Elder & Turner, 1995; Liao, 1999; Weider *et al.* 2005).

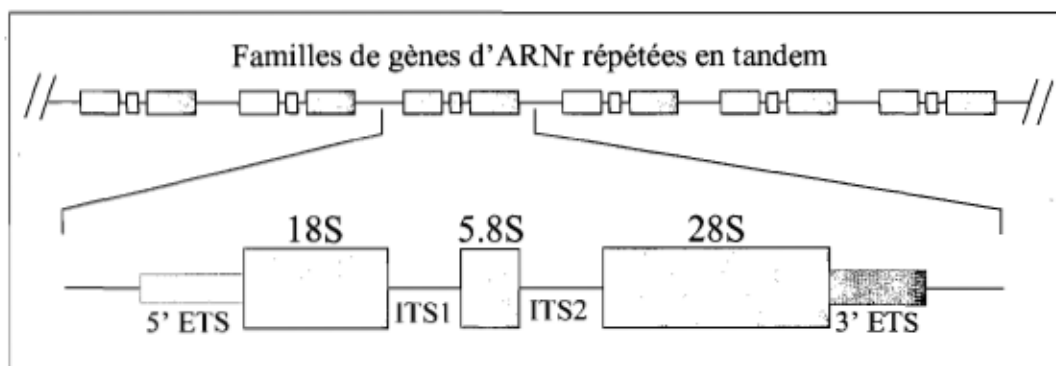


FIGURE 1.2 : Disposition en tandem des familles des gènes codant pour les ARNr 18S, 5.8S et 28S. Ces gènes sont transcrits en un seul large précurseur d'ARN (pre-ARN) qui contient les ITS1, ITS2 ainsi que le 5'ETS et le 3'ETS.

1.3 L'espaceur intergénique (IGS)

L'espaceur intergénique (IGS) est la région non transcrite située entre les familles de gènes d'ARNr, précisément entre les gènes 18S et 28S (Figure 1.3). Contrairement aux gènes d'ARNr, la séquence nucléotidique de l'IGS est divergente entre les espèces. En outre, l'IGS contient des séquences répétées dont le nombre variable est à l'origine de l'hétérogénéité de longueur des IGS rencontrée parmi les individus d'une même espèce, entre des espèces différentes et aussi dans une même cellule (Boseley *et al.* 1979; Paule & Lofquist, 1996). Ces séquences dont l'importance fonctionnelle est de réguler la transcription des gènes d'ARNr sont des « enhancers », « promoteurs » et des « terminators » qui constituent avec d'autres régions fonctionnelles de l'IGS les sites de fixation de pol I et de ses facteurs de transcription. L'arrangement de ces éléments régulateurs au sein de l'IGS est similaire parmi les espèces eucaryotes (Reeder, 1989, 1990; Paule & Lofquist, 1996). Ainsi, du site d'initiation de la transcription (*tis*) à l'extrémité 3' du 28S, on retrouve le promoteur central, le « upstream control element » ou « upstream promoter element » (UCE ou UPE), le « proximal terminator » (PT), Les « spacer promoters » (SP) puis les « terminators ». Finalement, on y retrouve dispersés les « enhancers » (Figure 1.4).

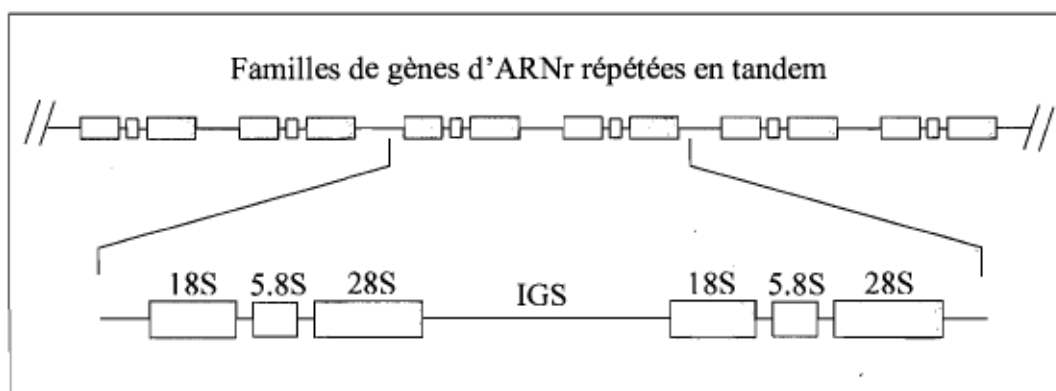


FIGURE 1.3 : L'espaceur intergénique (IGS) est la région non transcrite localisée entre les familles de gènes d'ARNr. Il contient les séquences d'ADN qui régulent la transcription des gènes d'ARNr.

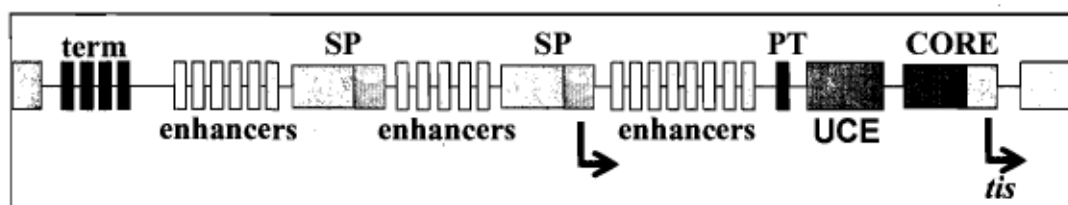


FIGURE 1.4 : Éléments régulateurs de l'IGS. Le promoteur central (CORE) autour du site d'initiation de la transcription (*tis*), l'« upstream control element » (UCE), le proximal terminator (PT), les enhancers, les spacer promoter (SP) et les terminators (term) (Paule, 1998).

Le promoteur central « core promoter » est la région sur laquelle pol I et ses facteurs de transcription se fixent pour débiter la transcription. Sa localisation est d'environ 40 pb avant le *tis* (-40) à 10 pb après le *tis* (+10) (Paule, 1998). Il est composé de deux régions fonctionnelles : une région entourant le *tis* et une autre située avant la précédente. Cette dernière est indispensable à l'assemblage des facteurs généraux de la transcription et de polI au niveau du promoteur central lors du processus initial de la transcription des ARNr (Kownin *et al.* 1985). La région entourant le *tis*, constitue le site au niveau duquel le double brin d'ADN se sépare pendant l'initiation de la transcription des ARNr; elle a également une faible interaction avec une partie des facteurs généraux de transcription. L'UCE est la région qui va du promoteur central à environ -150. Les travaux menés par Miller *et al.* 1985 ont démontré que l'UCE stimule la transcription des gènes d'ARNr *in vivo* et *in vitro* sous certaines conditions. De plus, l'UCE s'attache aux mêmes facteurs de transcriptions que ceux qui se lient au promoteur central et sa présence n'est pas indispensable à l'initiation de la transcription des gènes d'ARNr. Le PT est localisé dans une région qui se trouve environ 200 pb avant le *tis* (-200). Deux rôles lui sont attribués : Tout d'abord, il arrête la transcription à la suite de sa liaison avec un facteur de transcription appelé « termination factor TTF-I » (Grummt *et al.* 1986). Le PT stimule également l'initiation de la transcription. Les SP sont des promoteurs secondaires qui peuvent être en plusieurs copies dispersées au sein de l'IGS. Leur séquence est similaire à celle du promoteur central. Il a été démontré que ces SP

activent la transcription des gènes d'ARNr d'une manière dépendante de l'orientation (Grimaldi *et al.* 1990). La transcription peut débiter à partir des SP jusqu'au proximal terminator. Dans ce cas, les produits sont de courts transcrits (Reeder, 1989) dont il a été prouvé qu'ils entraînent la répression de la transcription des gènes d'ARNr (Mayer *et al.*, 2006).

Les « enhancers » sont des séquences répétitives disposées en tandem au sein de l'IGS. Ils ont pour fonction d'activer la transcription des gènes d'ARNr à partir du promoteur central en stimulant la fixation des facteurs de transcription sur le promoteur central et l'UCE. Leur caractère répétitif et leur rôle ont été décrits chez une variété d'espèces eucaryotes. En effet, grâce à des analyses fonctionnelles et mutationnelles, il s'est avéré que des répétitions de 60/81 pb, 140 pb, 240 pb/330 pb, trouvées respectivement chez *Xenopus*, la souris, *Drosophila melanogaster* activent la transcription des gènes d'ARNr (Busby & Reeder, 1983; Labhart & Reeder, 1984; Reeder, 1984; Grimaldi & Di Nocera, 1988; Kuhn *et al.*, 1990; Pikaard *et al.*, 1990; Grimaldi *et al.* 1990). Les enhancers répertoriés à travers les espèces eucaryotes partagent des caractéristiques communes; ils sont localisés avant le promoteur, sont capables d'activer la transcription indépendamment de leur orientation et peuvent être transcrits à partir de un ou plusieurs « spacer promoters » (Reeder, 1989, 1990). Les « terminators » permettent l'arrêt de la progression de polI et le détachement du pre-ARNr et de polI du brin d'ADNr. Ainsi, les terminators codent des signaux nécessaires à la terminaison de la transcription des ARNr. Ce sont des séquences répétitives disposées en tandem et localisées après l'extrémité 3' du gène 28S.

En résumé, l'IGS contient des éléments dont le rôle est de réguler la transcription des gènes d'ARNr. Parmi ces éléments, le promoteur central, constitue le site sur lequel se fixent pol I et ses facteurs de transcription afin d'initier la transcription. Les spacer promoters activent la transcription tout comme les « enhancers » qui sont des éléments répétés en tandem. Un autre rôle connu des « spacer promoters est la répression de la transcription. Les « terminators » sont également disposés en tandem après l'extrémité 3' du 28S et constituent le signal d'arrêt de la transcription. L'existence d'une

hétérogénéité de longueur des IGS s'explique par la présence en son sein d'un nombre variable d'éléments répétitifs, notamment d'enhancers, de spacer promoteurs et de terminators.

1.4 Gènes d'ARNr et croissance

La quantité de ribosomes synthétisés est liée à la croissance d'un organisme (Ju & Warner, 1994). En réponse à des signaux environnementaux tels que la présence de facteurs de croissance et la disponibilité des nutriments, une cellule ajuste sa quantité de ribosomes en fonction de ses besoins en protéines (Stefanovsky *et al.*, 2001); ce qui se traduit principalement par une régulation du nombre de ribosomes synthétisés et parallèlement, une régulation du taux de transcription des gènes d'ARNr. Par exemple, un organisme à croissance élevée a besoin d'augmenter sa production de ribosomes afin que ces derniers supportent sa demande en protéines; pour ce faire, il doit augmenter sa synthèse de ribosomes, il en résulte donc une augmentation du taux de transcription des gènes d'ARNr.

La majorité des études ayant permis d'établir la relation entre transcription des ARNr, quantité de ribosomes, et taux de croissance chez les eucaryotes ont utilisés comme modèle la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, Fahy *et al.* (2005) ont remarqué qu'une variation du niveau de transcription des gènes d'ARNr s'opérait subséquent au changement de phase de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, lorsque les cellules entraient en période de croissance stationnaire caractérisée par une absence de croissance; le taux de transcription des gènes d'ARNr diminuait (Fahy *et al.*, 2005; Waldron, 1977). Par contre, une fois que les cellules étaient placées dans un milieu favorisant une croissance élevée, elles entraient en période de croissance exponentielle et les niveaux de transcription des ARNr augmentaient. Ju & Warner (1994) ont également noté une réduction du taux de transcription des ARNr d'environ 90% lorsque les cellules de levures passent d'une phase exponentielle de croissance à une phase stationnaire. De plus, dans des cellules cancéreuses dont la croissance est incontrôlée, l'activation constitutive de certaines voies de signalisation entraîne

l'activation de la transcription par pol I, ce qui a pour conséquence d'augmenter la synthèse de ribosomes (Ruggero & Pandolfi, 2003). Le taux de transcription des gènes d'ARNr d'un organisme est donc lié à sa croissance.

Dans une cellule en croissance ou qui se divise, la majorité des ARN transcrits sont des ARNr. Par exemple, en période de croissance rapide, la levure *Saccharomyces cerevisiae* transcrit les ARN dans les proportions suivantes : 80% d' ARNr, 15% d'ARNt, et seulement 5% d'ARNm (Warner, 1999). Par ailleurs, la synthèse des ARNr représente 60% à 80% de l'activité transcriptionnelle totale d'une cellule (Fahy *et al.*, 2005; Moss & Stefanovsky, 2002). La majeure partie de la transcription qui s'effectue dans une cellule en croissance est donc dédiée à la synthèse des ARNr. Le contrôle de la croissance de la cellule nécessite par conséquent une régulation rigoureuse du taux de transcription des ARNr.

Plusieurs éléments sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr. Tout d'abord, l'IGS car il contient des régions qui sont les sites de fixation de pol I et de ses facteurs de transcription. Ces régions qui sont des « enhancers », promoteurs, « terminators », et « spacer promoters » constituent les séquences d'ADN régulatrices de la transcription des gènes d'ARNr. Les mécanismes épigénétiques constituent aussi un processus important de régulation, notamment de part leur influence sur le nombre de copies de gènes d'ARNr actives. Il existe donc deux formes de régulation de la quantité d'ARNr transcrits; la première agit sur le taux de transcription des ARNr et fait intervenir les régions régulatrices de l'IGS; la seconde modifie la proportion de gènes d'ARNr actifs/inactifs par des mécanismes épigénétiques.

1.5 Mécanismes de régulation de la transcription des gènes d'ARNr

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est empaqueté sous forme de chromatine. Le premier niveau d'organisation de la chromatine comprend plusieurs unités, les nucléosomes qui sont formés d'ADN superenroulé autour de protéines appelées histones. Les nucléosomes sont eux-mêmes organisés en structure plus compacte par des

protéines non histones. La majorité des gènes transcrits sont localisés au niveau de l'euchromatine ou « chromatine ouverte » qui est une structure de la chromatine dans laquelle l'ADN est empaqueté de manière moins condensée; ces gènes sont dit gènes actifs (Elgin, 1988; Mathis *et al.*, 1980). Par contre, les gènes inactifs sont associés à l'hétérochromatine ou « chromatine fermée » dans laquelle l'ADN y est très condensé, ce qui le rend inaccessible aux facteurs de transcriptions et empêche donc toute activité transcriptionnelle. La structure de la chromatine au niveau des gènes d'ARNr joue donc un rôle important dans la régulation de leur transcription.

De nombreuses données permettent d'affirmer que l'état de la chromatine au niveau des régions régulatrices des gènes d'ARNr est déterminant dans l'activation ou l'inactivation de ces derniers. Par exemple, l'IGS de l'ADNr de la grenouille *Xenopus* présente à la fois des régions enrobées dans les nucléosomes et des régions qui en sont démunies. Les investigations subséquentes ont déterminé que les gènes d'ARNr actifs de *Xenopus* sont précédés par un « enhancer » dépourvu de nucléosome tandis que les gènes silencieux et leurs séquences régulatrices sont empaquetés dans les nucléosomes (Lucchini & Sogo, 1992). De même, Dammann *et al.* (1995) prouvent que les régions d'ADNr non transcrites de la levure possèdent des enhancers contenus dans les nucléosomes tandis que les ADNr transcrits ont des enhancers non nucléosomiques. De toutes les copies de gènes d'ARNr retrouvées dans une cellule, seul un certain nombre, soit environ la moitié est sous forme active d'euchromatine, ne formant pas de nucléosomes et donc susceptible d'être transcrit; le reste des gènes est inactif, enrobé dans les nucléosomes pour former l'hétérochromatine (Conconi *et al.* 1989; Dammann *et al.* 1993, 1995; Flavell, 1986; Grummt & Pikaard, 2003; McKnight & Miller, 1976; Miller & Beatty, 1969). Toutefois, sous certaines conditions, lorsqu'une cellule a besoin d'une grande quantité d'ARNr, il se produit une activation d'une partie des gènes d'ARNr inactifs. Ainsi, selon les besoins de la cellule, on observe un changement d'état de la chromatine au niveau des gènes d'ARNr inactifs; en effet, celle-ci peut passer de l'état inactif à un état actif aboutissant à une augmentation de la transcription de l'ADNr. Par exemple chez la levure *Saccharomyces cerevesiae*, il se produit une variation des proportions des gènes d'ARNr actifs et inactifs dépendamment de son niveau de

croissance. Dans un milieu riche en nutriments, lorsque *Saccharomyces cerevesiae* passe d'une phase exponentielle de croissance à une phase stationnaire de croissance, le pourcentage de gènes d'ARNr transcrits (gènes actifs) diminue de 17% (Fahy *et al.*, 2005). De plus, on observe une diminution de 29% du nombre de gènes d'ARNr actifs lorsque *Saccharomyces cerevesiae* est cultivé dans un milieu pauvre (Sandmeier *et al.*, 2002). Donc, le taux de transcription des gènes d'ARNr est en partie contrôlé par une variation du nombre de gènes d'ARNr actifs. Néanmoins, la régulation de la transcription des gènes d'ARNr est essentiellement assurée par la régulation du taux de transcription des gènes d'ARNr déjà actifs plutôt que par une modification de la proportion de gènes d'ARNr actifs versus gènes inactifs (Morrow *et al.* 1993). Par ex, seuls 50% du nombre total de copies de gènes d'ARNr de *Saccharomyces cerevesiae* est transcrit et ce, quel que soit le niveau de transcription. Banditt *et al.* (1999) démontrent également que l'effet des éléments régulateurs de la transcription est principalement dirigés vers les gènes déjà actifs. Dans leur étude, il se produisait une réduction très importante (50% et plus) du taux de transcription d'unités de gènes d'ARNr à la suite d'une délétion de leur enhancer. Ils ont ensuite démontré que cette réduction n'affectait pas le rapport gènes actifs/gènes inactifs qui existait avant la délétion; ce qui confirme que les éléments qui régulent le taux de transcription des gènes d'ARNr agissent principalement sur le taux de transcription des gènes d'ARNr déjà actifs.

1.5.1 Mécanismes épigénétiques

La régulation épigénétique de la transcription des gènes d'ARNr fait intervenir plusieurs mécanismes ayant pour but de modifier l'état de la chromatine et rendre les gènes d'ARNr actifs ou inactifs selon les besoins de la cellule. Parmi ces mécanismes, on retrouve la méthylation de l'ADN et des histones, l'acétylation et déacétylation des histones. Tous ces mécanismes agissent de concert ou séparément afin d'activer ou d'inactiver les gènes d'ARNr. Ainsi, dans une étude réalisée sur la plante *Arabidopsis thaliana*, l'observation du degré de méthylation des cytosines au niveau du promoteur des gènes d'ARNr a révélé qu'une importante partie des gènes d'ARNr étaient hyperméthylés au niveau de leur promoteurs tandis qu'une autre portion, moins importante des gènes d'ARNr ne présentaient pas de méthylation au niveau des

cytosines (C) de leur promoteur. De plus, à l'aide de certaines analyses, Ils ont également pu déterminer l'état de méthylation des histones se trouvant au niveau des gènes d'ARNr et qui entrent dans la formation du nucléosome. Ainsi, ils ont découvert qu'une des histones associée aux gènes d'ARNr, précisément l'histone 3 (H3) est soit méthylé deux fois, soit trois fois respectivement sur sa lysine 9 et lysine 4. Des analyses complémentaires leur ont permis de conclure que les gènes d'ARNr actifs sont caractérisés par une histone H3 triméthylée sur la lysine 4 associée à l'hypométhylation des C au niveau du promoteur de ces gènes. Les gènes d'ARNr inactifs sont associés à H3 diméthylée sur la lysine 9 et un promoteur hyperméthylé au niveau de ses cytosines (Lawrence *et al.*, 2004; Lawrence & Pikaard, 2004). De plus, Lawrence & Pikaard, (2004) ont également montré que la suppression de la méthylation de l'ADNr couplée à une déacétylation de certaines histones aboutissait à l'activation de gènes d'ARNr qui étaient auparavant inactifs. En outre, lorsque *Saccharomyces cerevesiae* entre en phase stationnaire de croissance, il a été démontré que la déacétylation indirecte des histones H3 et H4 par l'histone déacétylase RPD3a entraîne l'inactivation des gènes d'ARNr; ce qui se traduit par une réduction de la production d'ARNr (Sandmeier *et al.*, 2002).

Des études antérieures réalisées chez certaines espèces de plantes avaient déjà mis en lumière une corrélation entre la méthylation de résidus cytosines au niveau de certaines régions de l'IGS, la longueur de ces dernières et l'activation des gènes d'ARNr. Ces études ont mené aux conclusions suivantes : D' une part, les organisateurs nucléolaires transcriptionnellement actifs présentent un plus grand nombre de gènes d'ARNr hypométhylés au niveau de cytosines comparativement aux organisateurs nucléolaires moins actifs (Flavell *et al.*, 1988; Houchins *et al.*, 1997). D'autre part, la comparaison entre les longueurs des IGS montre que, contrairement aux IGS courts, les IGS longs sont retrouvés dans les organisateurs nucléolaires les plus actifs et présentent une plus importante hypométhylation de leur site CCGG (Sardana *et al.*, 1993).

Une autre étude menée cette fois ci sur des cellules cancéreuses du foie humain a révélé que contrairement aux cellules non cancéreuses qui produisent beaucoup moins d'ARNr, les cellules cancéreuses présentaient une hypométhylation plus élevée au

niveau des îlots CpG des promoteurs des gènes d'ARNr. Donc, l'hypométhylation de ces îlots CpG entraîne une très forte augmentation de la transcription des gènes d'ARNr nécessaire à la croissance démesurée de ces cellules cancéreuses (Ghoshal *et al.*, 2004). En résumé, la méthylation des cytosines de certaines régions régulatrices des gènes d'ARNr entraîne l'inactivation de ces gènes; il en est de même pour la déacétylation des histones se trouvant à proximité des gènes d'ARNr (Santoro & Grummt, 2005). Cette dernière conclusion est conforme aux connaissances déjà établies qui associent l'inactivation de gènes non ribosomiaux à la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. Par contre, l'hypométhylation du promoteur des gènes d'ARNr et l'acétylation des histones caractérise les gènes d'ARNr actifs (Chen & Pikaard, 1997; Eberharter & Becker, 2002; Lawrence & Pikaard, 2004; Mizzen & Allis, 1998; Preuss & Pikaard, 2007) (Figure 1.5). L'ordre chronologique menant à l'inactivation des gènes d'ARNr débute d'abord par une déacétylation des histones suivi d'une méthylation des CpG du promoteur; cette séquence d'évènements abouti à la fermeture de la chromatine, donc à la formation de l'hétérochromatine et empêche l'assemblage de la machinerie de transcription (facteurs de transcription et pol I) au niveau du promoteur (Houchins *et al.*, 1997; Santoro & Grummt, 2005)

Tous ces changements observés sur des cytosines et des histones des gènes d'ARNr déterminent en fait le changement d'état de la chromatine au niveau des gènes d'ARNr. Ainsi, la chromatine prend une configuration ouverte (euchromatine) ou fermée (hétérochromatine) respectivement en empêchant ou permettant l'accès de la machinerie de transcription aux régions régulatrices telles que les promoteurs et les enhancers se trouvant dans l'IGS, d'où la modulation de la transcription exercée par ces mécanismes épigénétiques. Pour finir, les enzymes responsables de ces processus épigénétiques sont les histones déacétylases (HDACs), les histones acétyltransférases (HATs) (Roth *et al.*, 2001) et les ADN méthyltransférases. Leurs mécanismes d'action ont fait l'objet de nombreuses études qui ne seront pas détaillés ici. On peut citer quelques unes des molécules importantes dans les processus épigénétiques qui affectent l'état de la chromatine des gènes d'ARNr; ces molécules sont les suivantes : « Nucleolar remodeling complex » NoRC dont il a été prouvé qu'elle rend les gènes d'ARNr

silencieux en établissant un environnement hétérochromatique au niveau du promoteur par un mécanisme aboutissant au recrutement des histones deacétylases et des ADN méthyltransférases (Santoro *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2002). L'enzyme Dnmt1 dont l'activité de méthylation des régions régulatrices des ADNr est associée à l'inactivation des ces derniers (Majumder *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004).

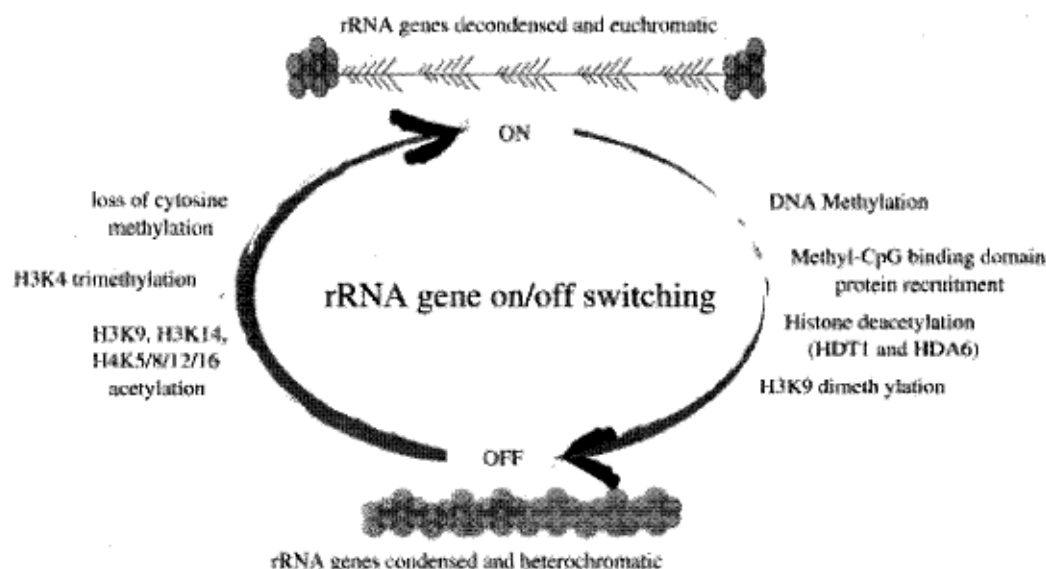


FIGURE 1.5: Contrôle épigénétique de l'activation des gènes d'ARNr. Les gènes d'ARNr actifs se trouvent dans l'euchromatine tandis que les gènes inactifs se trouvent dans l'hétérochromatine. Les mécanismes qui rendent ces gènes actifs incluent la déméthylation de cytosines, la méthylation et l'acétylation de lysines particulières sur certaines histones. Par contre, la méthylation de l'ADN et de certaines lysines d'histones, la deacétylation de certaines histones sont des mécanismes qui engendrent la présence de l'hétérochromatine au niveau des gènes d'ARNr et les rend ainsi inactifs (Preuss & Pikaard, 2007).

1.5.2 Hétérogénéité de longueur des IGS

L'hétérogénéité de longueur des IGS résulte de la variation du nombre de copies d'éléments répétitifs qui s'y trouvent. Par conséquent, les IGS longs possèdent plus

d'éléments répétitifs que les IGS courts. L'existence de l'hétérogénéité de longueurs d'IGS a été rapportée entre différentes espèces, entre les individus d'une même espèce et aussi chez un même individu. Les études qui se sont penchées sur la signification fonctionnelle d'une telle variation de longueur des IGS ont mis en lumière le fait que dans une population donnée, les individus présentant les IGS les plus longs ont un taux de croissance plus élevé que celui des individus ayant les IGS plus courts. Le rôle des éléments répétitifs de l'IGS qui sont souvent des enhancers et des spacer promoteurs est d'augmenter le taux de transcription des ARNr (Grimaldi & Di Nocera, 1988; Grimaldi *et al.*, 1990; Kohorn & Rae, 1982); par conséquent, la variation de leur nombre entraîne une variation du taux de transcription des ARNr et parallèlement celle du taux de croissance (Flavell, 1986; Reeder, 1984); d'où leur impact sur le taux de croissance.

L'hétérogénéité intra et interspécifique de longueur des IGS rencontrée chez *Daphnia* est dû à la présence d'un nombre variable de régions de 330 paires de bases (pb) et 200pb approximativement contenant des répétitions (promoteurs, enhancers, terminators) (Crease 1993). Cette hétérogénéité de longueur des IGS a été corrélée au taux de croissance dans une étude réalisée par Gorokhova *et al.* (2002) sur des populations de *Daphnia pulex* à croissance différente. L'amplification par PCR de la portion de l'IGS renfermant les régions de 330pb a révélé la présence de deux génotypes dans chacune des populations; soit un génotype « simple bande » composé d'un fragment unique d'environ 1.5 kb et un génotype « double bande » comprenant le fragment de 1.5 kb plus un autre fragment d'environ 0.92 kb. En observant la fréquence des génotypes dans les deux populations, les chercheurs ont déterminé que la population dans laquelle les individus à génotype « simple bande » prédominaient présentait un taux de croissance plus élevé que celle dans laquelle les individus « double bande » prédominaient. Les individus à génotype « simple bande » ne renferment au total que des IGS longs qui favorisent un taux de croissance élevé alors que les individus à génotype « double bande » possèdent à la fois des IGS longs et courts ; ce qui favorise un taux de croissance plus bas à cause de la présence des IGS courts. Une autre étude menée par Weider *et al.* (2004) arrive à une conclusion similaire en utilisant comme modèles d'étude trois espèces de daphnie, soit *Daphnia pulex*, *D. pulicaria* et *D. magna*.

Chez ces trois espèces, une corrélation positive entre la longueur des IGS et le taux de croissance est également trouvée.

Déjà en 1983, Reeder *et al.* ont été parmi les premiers chercheurs à associer la longueur de l'IGS à la variation du taux de croissance. Pour ce faire, ils injectèrent dans des oocytes de *Xenopus laevis* des constructions plasmidiques comprenant des ADN_r avec des IGS de longueur variable. Ils observèrent alors que contrairement au IGS courts, le taux de transcription était plus élevé à partir du promoteur des IGS longs. Également, (Cluster *et al.*, 1987) ont obtenus par sélection artificielle une lignée de *Drosophila melanogaster* à développement rapide et une autre lignée à développement lent. Après analyses des longueurs d'IGS apparues dans ces deux lignées, ils se sont aperçus que les individus à IGS longs étaient majoritaires dans la lignée à développement rapide tandis que les individus à IGS courts étaient majoritaires dans la lignée à développement lent.

Divers travaux réalisés sur des eucaryotes ont donc permis de démontrer que l'hétérogénéité de longueur des IGS a une influence sur le taux de croissance mais aucune étude ne s'est intéressée à établir un tel lien chez les poissons. En outre, il est établi que la sélection naturelle et artificielle sur la croissance ou sur d'autres traits de vie importants favorise une longueur spécifique d'IGS (Rocheford *et al.* 1990; Gupta *et al.* 2002; Delany & Krupkin 1999; Grimaldi & Di Nocera 1988; Cluster *et al.* 1987). Ces résultats obtenus aussi bien chez des plantes que chez des animaux confirme l'importance fonctionnelle de l'hétérogénéité de longueur de l'IGS et indique que l'IGS subit une pression sélective lors du développement des organismes; de plus, l'évolution de l'IGS joue un rôle important dans l'adaptation des populations à leur environnement.

1.6 Signification écologique de l'hétérogénéité de longueur des IGS : L'hypothèse du taux de croissance «Growth Rate Hypothesis» (GRH)

L'hétérogénéité de longueur des IGS a également un effet sur des processus écologiques tels que la variation de la stoichiométrie C :N :P d'un organisme car cette

hétérogénéité constitue les bases génétiques de l'hypothèse du taux de croissance «Growth Rate Hypothesis» (GRH). Cette hypothèse a été formulée il y a une dizaine d'années par Elser *et al.* (Elser *et al.*, 2000; Weider *et al.*, 2005). Elle suggère qu'il existe une corrélation entre le taux de transcription des ARNr, le taux de croissance et la variation du rapport Carbone : Azote : Phosphore (appelée stoechiométrie C :N :P) d'un organisme. En effet, chez les invertébrés, la majorité du P présent dans l'organisme est incorporé dans les ARN synthétisés par la cellule. Or, près de 80% de la quantité d'ARN total contenu dans une cellule est de l'ARNr (Warner, 1999). Par conséquent, la variation du taux de croissance affecte la quantité de P utilisée pour synthétiser les ARNr. Ainsi, à croissance rapide, le taux élevé de transcription des gènes d'ARNr entraîne une utilisation d'une plus grande quantité de P disponible; à croissance lente, c'est l'inverse qui se produit. Ces variations de quantités de P utilisées entraînent donc une variation de la stoechiométrie C : N : P. Le GRH a été confirmée par plusieurs travaux portant sur des invertébrés tels que *Drosophila melanogaster* (Watts *et al.*, 2006) et *Daphnia pulex* (Gorokhova *et al.*, 2002). Étant donné que la variation de la longueur de l'IGS affecte le taux de transcription des ARNr et donc le taux de croissance, il existe donc une relation directe entre les longueurs des IGS d'un organisme, sa stoechiométrie C :N :P et son taux de croissance. L'hétérogénéité de longueur des IGS permet donc de lier un processus génétique à un trait d'histoire de vie important comme la croissance. Dans les études portant sur les écosystèmes aquatiques, cette hétérogénéité constitue donc une nouvelle voie qui est de plus en plus explorée par les chercheurs qui veulent améliorer la compréhension des phénomènes impliqués dans des interactions écologiques tels que le transfert trophique.

1.7 Le lac St-Pierre

Le lac St-Pierre (LSP) est le plus large des lacs appartenant au système du fleuve St- Laurent. C'est un lac peu profond abritant plusieurs espèces de poissons dont la plus abondante est la perchaude. En outre, ce lac possède entre ses rives nord et sud des masses d'eau distinctes qui offrent des conditions de croissance contrastantes. La perchaude, *Perca flavescens* est un poisson d'eaux douces d'importance commerciale et sportive en Amérique du nord. Ces dernières années, on constate que la surpêche a

entraîné une baisse des stocks de perchaudes comme le révèle la baisse des rendements et la taille plus petite des poissons (Marsden & Robillard 2004).

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Bien que plusieurs études aient établi le lien direct entre hétérogénéité de longueur des IGS et taux de croissance chez plusieurs espèces d'eucaryotes, aucune étude ne s'est intéressée à établir un tel lien chez les poissons (Weider *et al.*, 2005). L'hypothèse de notre étude est que chez les poissons, l'hétérogénéité de longueur des IGS a une influence sur le taux de croissance. Afin de tester cette hypothèse, on utilisera deux populations de perchaude du LSP provenant de la rive nord et sud. Puisque entre les rives du LSP, la présence de courants d'eaux très forts et de conditions de croissance contrastante pourraient avoir exercé une pression sélective différente sur les populations de chacune des rives aboutissant à la sélection d'un génotype particulier d'IGS, Il serait donc intéressant de développer un marqueur permettant de révéler l'hétérogénéité de longueurs d'IGS chez la perchaude du LSP. Un tel marqueur permettra de vérifier s'il existe chez la perchaude une prédisposition génétique à la croissance et d'estimer le potentiel de croissance des populations de perchaudes grâce à la révélation de leur génotype de longueurs d'IGS. Enfin, ce marqueur constituera un bon outil pour déterminer la structuration des populations et améliorer la compréhension de leur capacité de croissance.

L'objectif principal de l'étude est de développer chez la perchaude un marqueur génétique de croissance basé sur l'hétérogénéité de longueurs des IGS. Pour atteindre cet objectif, l'amplification et le séquençage d'un IGS entier a été réalisé. Par la suite, l'analyse de la structure de cet IGS a permis de déterminer la localisation des régions répétitives et de concevoir des amorces afin d'amplifier ces régions spécifiques contenant des répétitions. Pour finir, ces amorces ont été utilisées pour vérifier l'existence d'une hétérogénéité de longueur des IGS. Le prochain objectif est d'utiliser le marqueur développé ci-dessus afin d'évaluer l'existence d'une hétérogénéité de longueur des IGS chez des populations de perchaudes du Lac St Pierre (LSP).

En se basant sur ces différentes observations, notre prochain objectif a pour but d'établir l'importance fonctionnelle d'une telle hétérogénéité, surtout son effet sur le taux de croissance des perchaudes. Pour ce faire, le taux de croissance a été déterminé dans chacune des populations de perchaudes en utilisant deux indices, soit le rapport ARN/ADN et la longueur totale (LT) de chaque poisson. Le taux de croissance est finalement comparé aux génotypes d'IGS d'individus de perchaudes déterminés précédemment à l'aide du marqueur d'IGS. Ces différentes analyses permettront ainsi de vérifier si l'hétérogénéité de longueur des IGS a une influence sur la croissance des poissons.

CHAPITRE II

RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER VARIATION IN YELLOW PERCH, *PERCA FLAVESCENS* AND ITS POSSIBLE LINK TO SHORT-TERM GROWTH RATE

Ribosomal intergenic spacer variation in yellow perch, *Perca flavescens*, and its possible link to short-term growth rate

Bidénam Kakou¹ and Hélène Glémet^{1*}

¹Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec G9A 5H7, Canada

Bidenam.Kakou@uqtr.ca; Helene.GleMET@uqtr.ca

*Corresponding author

Abstract

The intergenic spacer (IGS) is located between ribosomal RNA (rRNA) gene families. Within the IGS are present a variable number of repetitive elements which are at the root of IGS length heterogeneity and are regulatory elements for rRNA gene transcription. This heterogeneity has been shown to have functional significance through its effect on growth rate. Here, the relationship between IGS length heterogeneity and short-term growth rate (RNA/DNA ratio) was investigated for yellow perch (*Perca flavescens*) from two contrasting sites in Lake St. Pierre (LSP), Quebec. For this, a yellow perch IGS was first entirely sequenced and its molecular organization uncovered. Yellow perch IGS structure shares some features with other species and reveals four discrete regions containing tandem repeat elements. PCR amplification of specific IGS repetitive regions resulted in the presence of three main genotypes for yellow perch in LSP. We found no apparent correlation between IGS length and short-term growth rate. Although these results suggest that IGS length heterogeneity has no effect on growth rate in natural yellow perch populations, our study is an important precursor for further work aiming to assess the role of IGS length variation in influencing growth rate.

Résumé

L'espaceur intergénique (IGS) est localisé entre les familles de gènes d'ARN ribosomiaux (ARNr). L'IGS contient un nombre variable d'éléments répétés qui est à l'origine de l'hétérogénéité de longueur des IGS; de plus, ces éléments régulent la transcription des gènes d'ARNr. Cette hétérogénéité a un rôle fonctionnel de part son effet sur le taux de croissance. Ici, la corrélation entre l'hétérogénéité de longueur de l'IGS et le taux de croissance à court terme (rapport ARN/ADN) a été étudié dans des perchaudes (*Perca flavescens*) provenant de deux sites contrastant du lac St-Pierre au Québec. Pour ce faire, un IGS de perchaude a été d'abord entièrement séquencé et sa structure moléculaire dévoilée. Ainsi, les résultats indiquent que la structure de l'IGS de perchaude partage certaines similarités avec les IGS d'autres espèces et comprend quatre régions renfermant des éléments répétés en tandem. L'amplification PCR de régions répétitives spécifiques chez la perchaude a donné trois principaux génotypes d'IGS révélés par la taille des fragments amplifiés. Nos résultats démontrent qu'il n'existe aucune corrélation entre la longueur d'IGS et le taux de croissance à court terme. Même si ces résultats suggèrent que l'hétérogénéité de longueur de l'IGS n'a aucun effet sur le taux de croissance de ces populations naturelles de perchaudes, notre étude constitue un important précurseur pour de futures études dont le but est d'établir l'influence de la variation de longueur d'IGS sur le taux de croissance.

Introduction

The multicopy genes encoding ribosomal RNA (rRNA) are arranged as family arrays. In higher eukaryotes, an rRNA gene family is composed of the 18S, 5.8S and 28S genes whose sequences are highly conserved across species (Goldman et al. 1983). The intergenic spacer (IGS) is the non-coding region located between rRNA gene families. In addition to its sequence divergence between species, the IGS presents a length variation among species, populations, individuals, and within a single cell (Paule and Lofquist 1996). This IGS length heterogeneity is due to the presence of regions containing a variable number of tandemly-arranged repeats which are enhancers, promoters, spacer promoters and terminators that are regulatory elements for rRNA genes transcription (Banditt et al. 1999, Caudy and Pikaard 2002, Jacob 1995, Pikaard et al. 1990). This heterogeneity has a functional significance through effects on growth rate. Indeed, IGS length variation has been positively correlated with growth rate in some invertebrate species. For example, a study conducted on two populations of *Daphnia pulex* has shown that individuals with longer IGS variants were predominant in the high growth-rate population while individuals with shorter IGS predominated in the low growth-rate population (Gorokhova et al. 2002). Furthermore, in two lineages of *Drosophila melanogaster* selected for differential development rate, individuals of the fast developing line increased their IGS lengths unlike those in the slow developing line. Also, a higher number of repeats were found within the longer IGS compared to smaller IGS (Cluster et al. 1987). Moreover, many studies on invertebrate species have found that the longer the IGS, the more repeats it contains, notably enhancers which increase

rRNA gene transcription rates allowing the organism to synthesize sufficient ribosomes needed to support protein requirements for rapid growth (Gorokhova et al. 2002, Grimaldi and Di Nocera 1988; Cluster et al. 1987; Fahy et al. 2005).

In the present study, we investigate whether a correlation exists between IGS length heterogeneity and short-term growth rate in yellow perch (*Perca flavescens*) from Lake St. Pierre (LSP), Quebec, where contrasting environmental conditions on each shore likely influences growth. Our first objective was to sequence and analyze a yellow perch IGS in order to highlight the location and reveal the organization of regions containing repeats. Our next goal was to reveal individual IGS length genotypes in yellow perch by designing a set of primers for the PCR-amplification of specific IGS regions containing repeats. The short-term growth rate of each individual was determined by RNA/DNA ratio and examined in relationship to IGS genotype.

Materials and methods

Fish and tissue collection

Yellow perch were collected in the summer of 2005 from the shallow littoral zone (<2.5 m depth) by electrofishing with a CataRaft boat (Smith-Root Inc., Meritt, Canada) along Lake St. Pierre (LSP) north and south shores (collection method approved by the Animal Care Committee of UQTR; Glémet and Rodriguez 2007). Fish collected were designated as either the north shore (NS) or the south shore (SS) samples (25 individuals each). North and south shores of LSP have contrasting environmental conditions (Frenette et al. 2006) likely to influence growth rate. In addition, the presence of a central maritime channel favours strong water current which likely prevent homogenization of north and south shore fish since lateral fish excursions are discouraged. Together, these elements are thought to exert a selective pressure that may lead to population differentiation and, therefore, favour the predominance of specific genotypes on each shore.

Fish were weighed (26.3 ± 5.5 , 47.9 ± 5.3 g respectively for NS and SS) and measured using the total length (118.8 ± 6.0 , 146.7 ± 6.0 mm respectively for NS and SS), then kept on dry ice in the field. In the laboratory, the liver was removed and the white muscle tissue dissected from the area posterior to the dorsal fin, well above the lateral line, on the left side of individual fish. Both tissues were stored at -80°C until analyses.

Entire IGS sequence characterisation

All genomic DNA were extracted from the liver tissue using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Mississauga, Canada). From one individual's genomic DNA, the entire intergenic spacer (IGS) was amplified by PCR using the AccuTaq LATM DNA Polymerase Mix (Sigma-Aldrich Inc., Oakville, USA) in a Mastercycler^R gradient 5331

(Eppendorf North-America Inc.). The primers used in the reaction were the forward (FIGS) 5'TGTCGGCTCTTCCTATCATTGTG 3' and the reverse (RIGS) 5'GAAAGTTGATAGGGCAGACATTTCG 3' designed respectively in the 5'end of 18S and the 3'end 28S in regions conserved among 9 fish species (Genbank accession numbers U34341; BX537263; X02995; AF308735; AF133089; X98839; AF518195; AF021880; X98841). The conserved region was identified by sequence comparison with the CLUSTAL algorithm (available at <http://align.genome.jp/>). The PCR reaction was performed in a 50 µl final volume containing 4 ng/ul template DNA, 400 nM of each primer, 500 uM dNTP Mix (10 mM of each dNTP), 1X Buffer for Accu Taq LA DNA Polymerase, 2% DMSO, 0.05 units/ul Accu Taq LA DNA Polymerase. PCR conditions were as follows: initial denaturation at 96°C for 30 s, 30 cycles at 94°C for 25 s (denaturation), 63°C for 15 s (annealing), 10 min at 72°C (extension) and 7 min of final extension at 72°C. Using a 7% agarose gel stained with ethidium bromide, PCR products were separated by electrophoresis along with the high DNA mass Ladder (Invitrogen Inc., Burlington, Canada) for size estimation.

To overcome the problem caused by the presence of repetitive elements, the sequencing strategy adopted consisted of a first step of IGS cloning followed by the creation of nested deleted plasmids with the Erase-a-base system (Promega, Madison, USA) (Butler and Doers 1995). Thus, following manufacturer's instructions, an approximatively 4 kb amplified fragment was cloned in a plasmid using the TOPO XL PCR cloning Kit (Invitrogen Inc., Burlington, Canada) and a library was constructed from the recombinant plasmid (plasmid plus inserted 4 kb fragment). From this library a recombinant plasmid was purified and subjected to an unidirectional Exonuclease III

digestion. As a result, a collection of plasmids carrying gradually deleted inserts were obtained and were used to create a new library from which plasmids were randomly selected and purified. The last step was the sequencing of each deleted insert using the same M13 Reverse priming site present in all plasmids. Sequencing was conducted at either Laval University (Centre de Bio-informatique et de biologie Computationnelle, Québec, Canada) or Qiagen (Qiagen sequencing services, Hilden, Germany) using either a standard or a hairpin run sequencing method.

Sequence assembly

Sequences were assembled into contigs with the *bl2seq* program (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) and the *Seqmerge* program (available in GCG, Accelrys Software Inc. via client subscription). Following the amplified fragment sequence reconstitution, the IGS boundaries were positioned by aligning the reconstituted sequence with the ends of 28S and 18S genes from sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Genbank accession number DQ660358) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Genbank accession number AF308735), respectively. IGS regions containing repeats (repetitive regions) were determined with the Tandem Repeats Finder program available at <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). Potential CpG islands were identified using the *Cpgplot* program (available at <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>).

IGS length heterogeneity

To reveal IGS length heterogeneity in yellow perch populations, PCR reactions were carried out to amplify each IGS repetitive region alone or several in combination using a total of four pairs of primers (for primer sequences, contact the authors). PCR products were run on a 1% agarose gel (w/v) with the low DNA mass Ladder (Invitrogen,

Burlington, Canada) for size estimation. The resulting banding patterns were visually analysed to detect length heterogeneity. The only obvious length heterogeneity was obtained with the use of primers, Forward 5' TGGAGCATGTTGAAAGTG 3' and Reverse 5'TCTCCGGTCAAACACTTAG 3' (primers P1 and P2) flanking the two first repetitive regions next to the 28S 3' end (Fig. 1). With these two later primers, the PCR reaction was performed using the Taq DNA Polymerase (Qiagen) with 400 ng of template DNA, 300 nmol' of each primer, 10 ul of 10x Qiagen PCR Buffer in a total volume of 100ul. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 3min, 25 cycles at 94°C for 30s (denaturation), 48°C for 45s (annealing), 10 min at 72°C (extension) and 10 min of final extension at 72°C. The percentage of yellow perch individuals carrying each genotype was determined for the north and south shore samples.

RNA/DNA ratio

Total nucleic acids were extracted from white muscle tissue and quantified according to a microfluorometric method (Kyle et al. 2003). RNA/DNA ratio was used to estimate individual short-term growth rate in yellow perch (Tardif et al. 2005; Glémet and Rodriguez, 2007).

Statistical analyses

All statistical analyses were conducted with SYSTAT™ version 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA) and results were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

The fragment amplified by PCR and sequenced is 4792 bp; it includes the 28S 3' end, the IGS and the 18S 5' end. Its sequence has been submitted to GenBank and the accession number is EU325541. The 28S 3' end position is found at nucleotide (nt) 471 and the 18S 5' end at nt 4573; therefore, the putative length of yellow perch IGS is 3989 bp ranging from nt 472 to nt 4572. Compared to the IGS of some fish, yellow perch IGS length is similar to that of the zebra fish, *Danio rerio* which ranges from 4kb to 7kb (Pelan 2004) but shorter than the IGSs of lake trout, *Salvelinus namaycush* and brown trout, *Salmo trutta* whose lengths are 9 kb-18 kb and 8-16kb, respectively (Castro et al. 1997; Reed and Phillips 2000). Among invertebrates, IGS lengths are more similar to yellow perch IGS, where in fact, *Daphnia* species and tadpole shrimp IGS ranges from 4kb to 5kb (Crease 1993; Luchetti et al. 2006).

Within the IGS are included four successive regions containing tandemly-arranged repeats (Fig. 1). From the 28S 3' end to the 18S 5' end, these regions, R1, R2, R3 and R4 are separated by non repetitive sequences. Such IGS structure is found in most eukaryotes species in which the general IGS organisation is constituted by a central region composed of repetitions and non-repetitive regions next to the 28S 3' end and the 18S 5' end (Baldridge and Fallon 1992; Ryu et al. 1999; Crease 1993; Reeder 1990). The R1 region is 652 bp and includes a 28-106 bp repeat element that is either complete or truncated (Fig. 1). The R2 region is 237 bp and contains four complete and one truncated 51 bp/62 bp repeat elements. The R3 region is 452 bp and has four complete and one truncated 91 bp repeat and finally, the R4 region is 613 bp and has five complete and one truncated 105 bp repeat. A BLAST search of repeat elements in yellow perch

resulted in no sequence similarities to other known sequences; as well, a search of available published databases did not allow the identification of precise regulatory elements. Many studies have established that IGS repetitive elements are regulatory elements for rRNA gene transcription, notably enhancers whose role is to increase rRNA transcription rate (Morales-Hojas et al. 2002; Wu and Fallon 1998). In fact, the enhancement of transcription has been shown for repetitive elements of 60/81 pb, 140 pb, 240 pb/330 pb found respectively in *Xenopus*, mouse and *Drosophila melanogaster* IGS (Busby and Reeder 1983; Labhart and Reeder 1984; Reeder 1984; Grimaldi and Di Nocera, 1988; Kuhn et al. 1990; Pikaard et al. 1990; Grimaldi et al. 1990). It is probable that in yellow perch, IGS repetitive regions (regions R1, R2, R3, and R4) include regulatory elements such as enhancers, spacer promoters, and terminators which have diverged from known regulatory sequences of other species.

The IGS sequence of yellow perch contains other elements that may have an implication in the transcriptional regulation of rRNA genes. Among these elements are poly (dA) tracts > 10 bases located mainly within the R1 region and between R2 and R3 regions. The presence of such poly (dA:dT) stretches in intergenic sequences of others eukaryotes has been related to the formation of a specific curved DNA that allows transcription factors to access DNA (Anderson and Widom 2001; Koch and Thiele 1999). Thus, these tracts are considered enhancers elements for gene transcription in general, and constitute functional promoter elements in yeast (Struhl 1985; Suter et al. 2000; Winter and Varshavsky 1989). It is probable that poly (dA) tracts present in the IGS sequence of yellow perch also play an important role in the transcriptional regulation of rRNA genes, as they do for other eukaryotes.

The IGS sequence of yellow perch contains CpG islands, confined to regions R3, R4 and downstream of R4. CpG islands are involved in the epigenetic regulation of genes via their methylation status (Gronbaek et al., 2007). In vertebrates, contrary to other genes in the genome, housekeeping genes, which include rRNA genes, are closely associated with hypomethylated CpG islands (Gardiner-Garden and Frommer 1987). As well, hypermethylated rDNA regions are not involved in the transcription regulation of mouse and human rDNA (Grozdanov and Karagyozev 2002, Mason et al. 1997, Shiraishi et al. 1999). These facts suggest that CpG islands within IGS subrepeats also play a role in the regulation of rRNA. In order to determine the exact functional role of all the repetitive elements found in the IGS of yellow perch, extensive functional analysis need be carried out in the future.

Regions R1 to R4 were PCR-amplified separately or in combination to test their ability to reveal IGS length heterogeneity among yellow perch individuals. Among all tests realized, only the amplification of the IGS segment containing both the R1 and R2 regions (R1+R2) revealed a clear length heterogeneity; the other tests gave little or no length differences. For that reason, primers P1 and P2 (Fig. 1) were chosen for amplifications to assess the IGS length heterogeneity in the north and south shore yellow perch samples from Lake St. Pierre (LSP). As a result, according to the length of amplified fragments in each yellow perch individual, three principal genotypes emerged: genotypes «long» (L), «short» (S) and «long and short» (LS) (Figure 2). Genotype L includes the longest fragment with sizes ranging from 2 kb to 2.3 kb; Genotype S is represented by the shortest fragments of 1.5 kb or less; and finally genotype LS is characterised by an amplification pattern having both fragments ranging from 2 kb-2.3 kb, as well as fragments of 1.5 kb or less (Fig. 2). Individuals carrying genotype L, thus

carry the highest number of repetitions, followed by LS individuals and finally S individuals possessing only the shortest fragment, and, therefore, carrying the least number of repetitions. In crustacean and fish, some studies have demonstrated that the IGS length heterogeneity is confined to specific regions. For example, the IGS length variation in *Daphnia pulex* is due to a central region containing a 330 pb/326 bp element (Gorokhova et al. 2002); for lake trout, *Salvelinus namaycush* the region adjacent to the 28S is responsible for IGS length variation (Zhuo et al. 1995) whereas in *Salmo trutta*, this variation is due to a region upstream of the 3'ETS (Castro et al. 1997). Here, only R1+R2 amplification revealed a length heterogeneity implying that in yellow perch, length variation is due to a 102 bp/106 bp and 51 bp/62 bp repeat element.

The frequencies of IGS length variants were similar between populations (Fig 3.). For NS/SS populations, respectively, 23.9/27.1% of yellow perch had genotype L; 45.7/47.9% carried genotype S and 30.4/25.0% had LS genotypes. The identical genotype frequency pattern found between the two shores suggests that there may be only one population instead of two discrete ones as we previously assumed. In fact, Leclerc et al. (2007) demonstrated the existence of only one yellow perch population in LSP using microsatellite markers. As such, neutral molecular markers are poor indicators of adaptive variation and are not likely to reflect population differentiation by selection (Beebe and Rowe 2004). This is contrary to the IGS length variation that can be modified by natural or artificial selection and, therefore, a more suitable tool for assessing functionally-significant population structuring (Weider et al. 2005). Still, the absence of genotypic structuring in LSP may reflect homogenization of upstream and downstream subpopulations along each shore.

Individual growth rates for yellow perch were evaluated using a short-term growth index, the RNA/DNA ratio. No significant differences were observed for the RNA/DNA ratios of IGS length variants from the NS and SS populations (Fig. 4) suggesting similar growth rates in response to recent environmental conditions. In our study, IGS length has no apparent correlation with short-term growth rate. This is contrary to previous work conducted on *Drosophila melanogaster* where it was established that there was a selective pressure favouring the predominance of longer IGS variants in fast developing lines while shorter IGS length variants were maintained in slow developing lines (Cluster et al. 1987). In addition, a study conducted on clonal lineages of *Daphnia pulex* showed that in lineages with high juvenile growth rate, the frequency of long IGS variants was higher than in lineages with lower growth rate (Gorokhova et al. 2002). These studies support the association found between IGS length heterogeneity and growth rate; longer IGS favouring higher growth rate because of the presence of more repeats notably enhancers elements which increase the rate of rRNA gene transcription and as a result higher growth rates are observed.

In the present study, the distribution pattern of IGS genotypes between shores did not reveal differences in population structure nor was there any apparent association with short-term growth as measured by RNA/DNA ratios. To better evaluate the link between IGS genotype distribution and growth rate, future studies should focus on those life stages of yellow perch less susceptible of forming homogenized populations. For example, young-of-the-year larvae emerging from the different spawning sites in LSP are less mobile than juvenile or adult fish and should be better suited to reveal sub populations likely to reflect local adaptation. The analysis of long-term growth patterns would offer a complementary tool to investigate the functional role of IGS length

variation. More specifically, back calculations based on analyses of bony structures would allow the comparison of age-specific growth rates among IGS genotypes. This technique would permit the identification of any growth advantage having occurred during the ontogeny, regardless of recent growth rates. In conclusion, our study showed that the structural organization of yellow perch IGS is similar to that of many other eukaryotes. Yellow perch IGS has many repetitions confined to four clusters each separated by non-repetitive regions. Despite the presence of two apparently discrete yellow perch populations in LSP, there is no evidence that selection pressures have favoured the occurrence of a specific IGS length heterogeneity in these populations. Although three IGS length variants were found within yellow perch of LSP, IGS length does not appear to be linked to differential growth rates as revealed by RNA/DNA ratios. Our study paves the way to future investigations trying to unravel the mechanisms connecting IGS length variation with a major life history trait, notably growth rate in fish.

Acknowledgements

We thank M. Léveillé and G. Trottier, for assistance with fish collection and for their laboratory work. We also thank A. Bertolo for his helpful insights to discussions during the preparation of the manuscript. Financial support was provided by an individual grant to H.G. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

References

- Anderson, J.D. and Widom, J. 2001. Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Mol. Cell Biol.* **21**: 3830-3839.
- Baldrige, G. D., & Fallon, A. M. (1992). Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus*. *DNA Cell Biol*, *11*(1), 51-59.
- Banditt, M., Koller, T., and Sogo, J.M. 1999. Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**: 4953-4960.
- Beebee, T.J.C., and Rowe, G. 2004. Molecular and adaptive variation. In. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press. pp. 145-164.
- Busby, S.J. and Reeder, R.H. 1983. Spacer sequences regulate transcription of ribosomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell*, **34**: 989-996.
- Butler, B. and Doers, M. 1995. Generation of Nested Deletions using the Erase-A-Base® System. *Promega Notes* **53**: 36-38.
- Castro, J., De Lucchini, S., Nardi, I., Sanchez, L., and Martinez, P. 1997. Molecular analysis of a NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*): organization of rDNA intergenic spacers. *Genome*, **40**: 916-922.
- Caudy, A.A. and Pikaard, C.S. 2002. *Xenopus* ribosomal RNA gene intergenic spacer elements conferring transcriptional enhancement and nucleolar dominance-like competition in oocytes. *J. Biol. Chem.* **277**: 31577-31584.
- Cluster, P.D., Marinkovic, D., Allard, R.W., and Ayala, F.J. 1987. Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes,

- and adaptation in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **84**: 610-614.
- Crease, T.J. 1993. Sequence of the intergenic spacer between the 28S and 18S rRNA-encoding genes of the crustacean, *Daphnia pulex*. Gene, **134**: 245-249.
- D'Alessio, J.M., Harris, G.H., Perna, P.J., and Paule, M.R. 1981. Ribosomal ribonucleic acid repeat unit of *Acanthamoeba castellanii*: cloning and restriction endonuclease map. Biochemistry **20**: 3822-3827.
- Fahy, D., Conconi, A., & Smerdon, M. J. (2005). Rapid changes in transcription and chromatin structure of ribosomal genes in yeast during growth phase transitions. *Exp. Cell. Res.*, *305*(2), 365-373.
- Frenette, J.J., Ars, M.T., Morin, J., Gratton, D. and Martin, C. 2006. Hydrodynamic control of the underwater light climate of the fluvial Lac Saint-Pierre. Limnol. Oceanogr. **51**(6): 2632–2645.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. J. Mol. Biol. **196**(2), 261-282.
- Glémet, H. and Rodríguez, M.A. (2007). Short-term growth (RNA/DNA ratio) of yellow perch in relation to environmental influences and spatio-temporal variation in a shallow fluvial lake. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **64**(12): 1646-1655.
- Goldman, W.E., Goldberg, G., Bowman, L.H., Steinmetz, D., and Schlessinger, D. 1983. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. Mol. Cell Biol. **3**: 1488-1500.
- Gorokhova, E., Dowling, T.E., Weider, L.J., Crease, T.J., and Elser, J.J. 2002. Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a

- clonal organism under divergent selection for production rate. *Proc. Biol. Sci.* **269**: 2373-2379.
- Grimaldi, G. and Di Nocera, P.P. 1988. Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 5502-5506.
- Grimaldi, G., Fiorentini, P., and Di Nocera, P.P. 1990. Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **10**: 4667-4677.
- Gronbaek, K., Hother, C., and Jones, P.A. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* **115**: 1039–1059.
- Grozdanov, P.N. and Karagyozev, L. 2002. The mouse ribosomal DNA amplification promoting sequence 1 is highly methylated and repeated in the genome. *Z. Naturforsch* **57**: 897-901.
- Jacob, S.T. 1995. Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochem. J.* **306**: 617-626.
- Koch, K.A. and Thiele, D.J. 1999. Functional analysis of a homopolymeric (dA-dT) element that provides nucleosomal access to yeast and mammalian transcription factors. *J. Biol. Chem.* **274**(34): 23752-23760.
- Kuhn, A., Deppert, U., and Grummt, I. 1990. A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 7527-7531.
- Kyle, M., Watts, T., Schade, J., and Elser, J.J. 2003. A microfluorometric method for quantifying RNA and DNA in terrestrial insects. *J. Insect Sci.* **3**: 1.
- Labhart, P. and Reeder, R.H. 1984. Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell*, **37**: 285-289.

- Leclerc, É., Mailhot, Y., and Bernatchez, L. 2007. Définition des populations de perchaudes (*Perca flavescens*) du fleuve St-Laurent au Québec : Analyse du patron géographique de la variation génétique et morphologique. In. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- Luchetti, A., Scanabissi, F., and Mantovani, B. 2006. Molecular characterization of ribosomal intergenic spacer in the tadpole shrimp *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Genome*, **49**: 888-893.
- Mason, S.W., Sander, E.E., and Grummt, I. 1997. Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *EMBO J.* **16**: 163-172.
- Morales-Hojas, R., Post, R.J., Cheke, R.A., and Wilson, M.D. 2002. Assessment of rDNA IGS as a molecular marker in the *Simulium damnosum* complex. *Med. Vet. Entomol.* **16**: 395-403.
- Paule, M.R. and Lofquist, A.K. 1996. Organization and expression of eukaryotic ribosomal RNA genes. In *Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis* (ed. R. A. Zimmerman & A. E. Dahlberg), pp. 395-420. CRC Press, New York.
- Pelan, S. 2004. Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 14, complete sequence. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Pikaard, C.S., Pape, L.K., Henderson, S.L., Ryan, K., Paalman, M.H., Lopata, M.A., Reeder, R.H., and Sollner-Webb, B. 1990. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell Biol.* **10**: 4816-4825.
- Reed, K.M. and Phillips, R.B. 2000. Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Chromosome Res.* **8**: 5-16.

- Reeder, R.H. 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell*, **38**: 349-351.
- Reeder, R.H. 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* **6**: 390-395.
- Ryu, S. H., Do, Y. K., Hwang, U. W., Choe, C. P., & Kim, W. (1999). Ribosomal DNA intergenic spacer of the swimming crab, *Charybdis japonica*. *J Mol Evol*, **49**(6), 806-809.
- Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Chuu, Y.H., and Sekiya, T. 1999. Alteration of mosaic methylation of the repeat unit of the human ribosomal RNA genes in lung cancer. *Biol. Chem.* **380**: 81-84.
- Struhl, K. 1985. Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 8419-8423.
- Suter, B., Schnappauf, G., and Thoma, F. 2000. Poly(dA.dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters in vivo. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4083-4089.
- Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B., and Markow, T. A. 2005. The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **36**: 219-242.
- Winter, E. and Varshavsky, A. 1989. A DNA binding protein that recognizes oligo(dA).oligo(dT) tracts. *EMBO J.* **8**: 1867-1877.
- Wu, C.C. and Fallon, A.M. 1998. Analysis of a ribosomal DNA intergenic spacer region from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **7**: 19-29.
- Zhuo, L., Reed, K.M., and Phillips, R.B. 1995. Hypervariability of ribosomal DNA at multiple chromosomal sites in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Genome* **38**: 487-496.

Figure captions

Figure 1. General IGS structure for yellow perch, *Perca flavescens*. The IGS is the region between the 28S and 18S rRNAs. Repetitive regions R1, R2, R3, R4 found in the IGS are displayed in white boxes; they are separated by non-repetitive regions. Primers RIGS and FIGS were used for amplification of the entire IGS. Primers P1 and P2 were used for PCR amplification of repetitive regions (R1+R2) in order to reveal IGS length heterogeneity in yellow perch samples from Lake St. Pierre.

Figure 2. Banding patterns obtained for yellow perch, *Perca flavescens* revealed by the PCR amplification of the R1 + R2 regions. Genotype «Long» (L) represented by a single 2.5 kb band, «Long and Short» (LS) represented by a 2.5 kb and 1.5 kb double band, and «Short» (S) by a single band of 1.5 kb. M is the molecular ladder.

Figure 3. Frequency of individuals carrying the L (grey bars), S (black bars) and LS genotypes (white bars) in the north shore (NS) and the south shore samples (SS) of yellow perch, *Perca flavescens* from Lake St. Pierre. Pearson Chi-square ($p=0.832$)

Figure 4. RNA/DNA ratios (least square mean \pm s.e.) of individuals carrying the L (grey bars), S (black bars) and LS genotypes (white bars) for north (NS) and south shore (SS) yellow perch, *Perca flavescens* samples from Lake St. Pierre. One-way ANOVA (logweight as covariable; $p=0.413$)

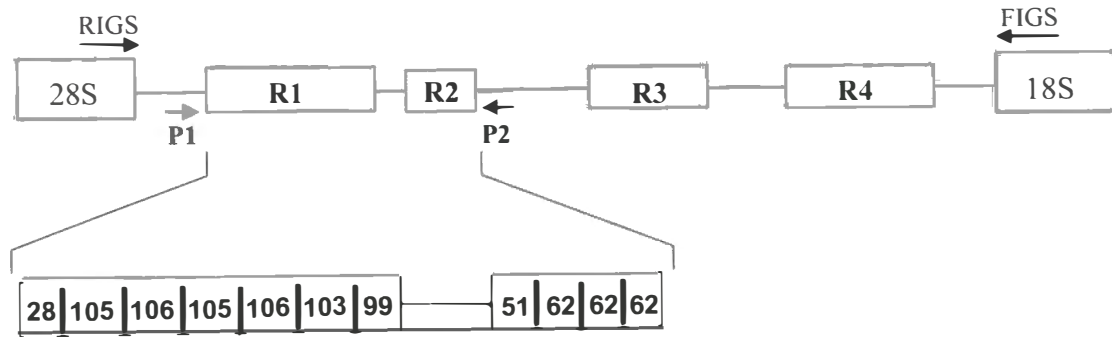


Fig. 1

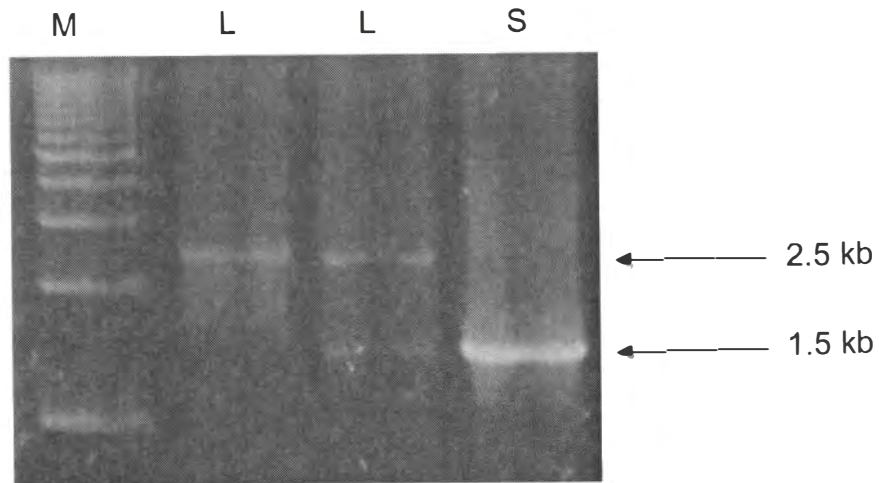
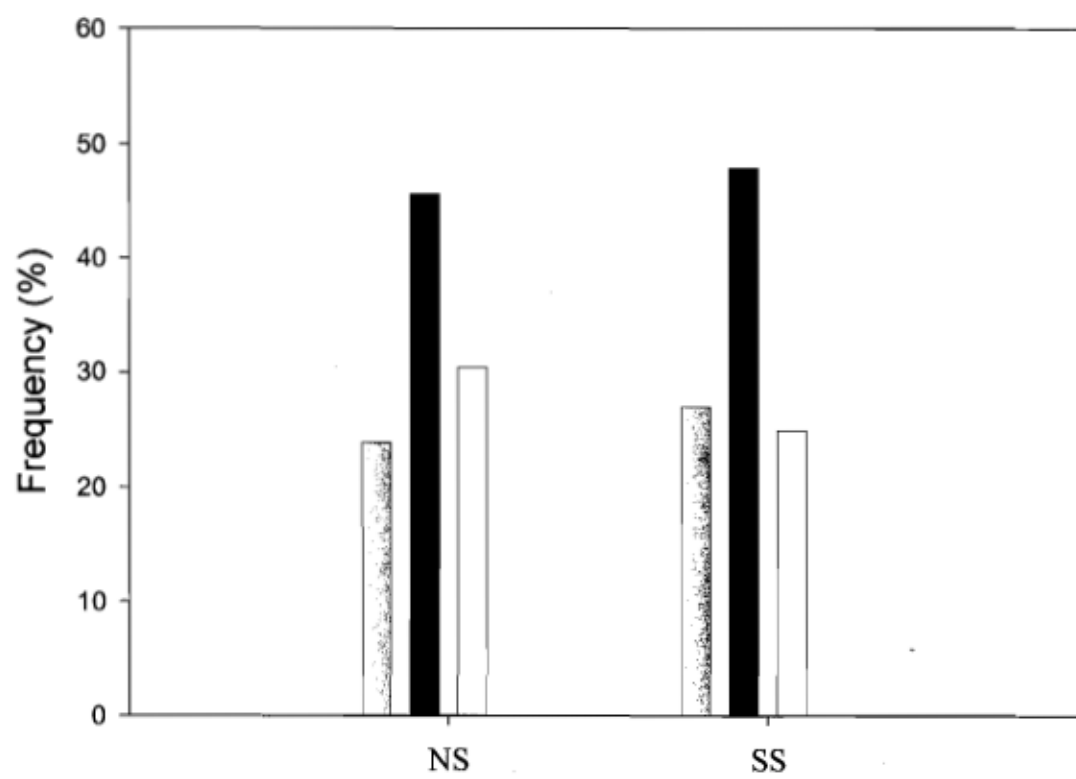
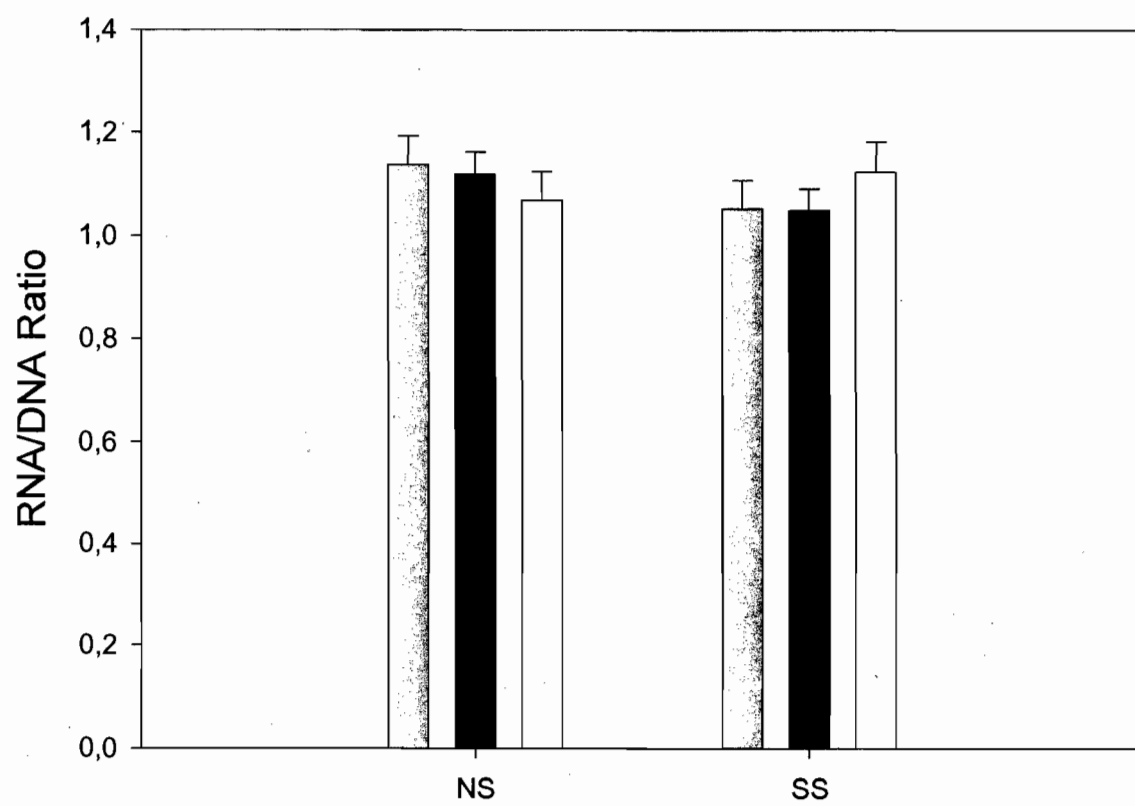


Fig.2

**Fig. 3**

**Fig. 4**

CHAPITRE III
DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Structure de l'IGS

Les séquences d'ADNr régulant la transcription des gènes d'ARNr sont circonscrites au niveau de l'IGS. À l'exception du promoteur central, de l'UCE et du PT, les autres séquences régulatrices (enhancers, terminators et SP) sont sous forme de répétitions en tandem. En outre, la variation du nombre de ces répétitions, surtout des enhancers, est à l'origine de l'hétérogénéité de longueur des IGS retrouvée entre individus d'une population, chez un individu, et aussi dans une cellule (Boseley *et al.* 1979; Paule & Lofquist, 1996). Chez les poissons, les longueurs d'IGS connues jusqu'à présent sont celles de *Danio rerio*, de *Salvelinus namaycush*, et de *Salmo trutta* qui se situent respectivement dans les intervalles 4kb-7kb, 9 kb-18 kb et 8-16kb (Pelan 2004, Reed & Phillips 2000; Castro *et al.* 1997). L'IGS de perchaude entièrement amplifié puis séquencé dans notre étude a une taille estimée à environ 4kb (3989 pb plus précisément).

L'IGS de perchaude a une taille similaire à celles répertoriées chez plusieurs invertébrés tels que les crustacés *Daphnia pulex* et *Triops cancriformis* (Crease 1993, Luchetti *et al.* 2006) et aussi le poisson *Danio rerio* (Pelan 2004). Par contre, la taille d'IGS de perchaude est inférieure aux tailles d'IGS de *Salvelinus namaycush* et *Salmo trutta*. Cependant, la taille de cet IGS de perchaude ne reflète pas nécessairement toutes les tailles d'IGS qu'on peut retrouver chez la perchaude. En effet, lors de l'amplification, les conditions PCR ont été ajustées afin d'amplifier les IGS d'une taille maximale de 7 kb. De plus, (Mateos & Markow 2005) ont démontré que l'amplification PCR est une méthode qui sous-estime la taille réelle de l'IGS lorsque cette dernière est supérieure à 5kb. Bien que la représentativité des tailles d'IGS de perchaude ne soit pas l'objectif de cette étude, on pourrait en avoir une meilleure idée en ayant recours à d'autres méthodes telles qu'une série d'amplifications PCR dont les conditions permettraient de couvrir une plus grande variété de tailles d'IGS ou le « Southern Blot Hybridization » (SB) qui est une méthode couramment utilisée pour déterminer les tailles d'IGS; cette dernière méthode permet de déterminer de manière plus précise

toutes les tailles d'IGS présentes dans une cellule (D'Alessio *et al.* 1981, Mateos & Markow 2005, Reed & Phillips 2000).

Chez la majorité des espèces eucaryotes, l'organisation structurale de l'IGS est la suivante : une partie centrale composée de séquences répétitives et les régions proches du 18S et 28S qui ne contiennent pas de répétitions. Par contre, l'arrangement des répétitions varie d'une espèce à une autre. Par exemple, l'IGS de *Aedes albopictus* possède des répétitions en tandem regroupées dans une seule région (Baldrige & Fallon 1992). Par contre, chez certaines espèces, les répétitions sont regroupées au sein de deux ou plusieurs régions; dans ce cas, les répétitions de chacune de ces régions ont soit une séquence consensus identique, soit une séquence consensus différente. Ainsi, *Daphnia pulex* contient deux types de répétitions en tandem groupées dans deux régions; la première région contenant une répétition en tandem de 330 pb et la seconde région une autre répétition en tandem de 200 pb de séquence divergente (Crease 1993). Le crabe *Charybdis japonica* renferme dans son IGS quatre régions contenant des répétitions en tandem ayant des séquences distinctes (Ryu *et al.* 1999). L'IGS de perchaude respecte également l'organisation générale retrouvée dans les IGS de plusieurs espèces: En effet, sa portion centrale est constituée de quatre régions contenant des répétitions. Ces régions qu'on a nommé R1, R2, R3, R4 sont de tailles variables et sont espacées par de courtes régions non répétitives. De plus, les portions de l'IGS proche des gènes 18S et 28S ne sont pas répétitives. En outre, les séquences consensus des répétitions qui constituent chacune des régions R1 à R4 sont différentes. D'autres IGS de poisson ont la même organisation structurale que l'IGS de perchaude. Ainsi, l'IGS de *Salmo trutta* possède trois régions contenant des répétitions en tandem qui sont responsables de la variation de longueur des IGS.

Même si l'IGS contient de nombreuses répétitions, la variation de sa longueur est généralement confinée à des sections précises. Il a ainsi été démontré que l'hétérogénéité de longueur des IGS de *Salmo trutta* repose sur une région située juste en aval du 3'external transcribed spacer (3'ETS) (Castro *et al.* 1997). Par contre, chez la souris, la variation de l'IGS est due à la région proche du 5'ETS (Arnheim *et al.* 1982). Chez

Salvelinus namaycush, la région la plus responsable de l'hétérogénéité de longueur de l'IGS est localisée plutôt dans la région adjacente au 28S (Zhuo *et al.* 1995). Chez l'humain aussi, la variation de longueur de l'IGS est principalement due à la région proche du 28S (LaVolpe *et al.* 1985).

Parfois, plusieurs régions sont responsables de la variation de la longueur de l'IGS. C'est ainsi que Delany et Krupkin 1999 ont comparé la longueur des IGS chez les descendants des populations de poules produites pour le commerce. Les populations sélectionnées selon leur reproduction et la qualité de leurs œufs ont été appelées « layer » tandis que celles sélectionnées selon la croissance et la qualité de leur chair ont été nommées « broiler ». Chez les « broilers », la variation de l'IGS est reliée à la fois à la région proche du 18S et à celle proche du 28S; par contre, la variation de l'IGS des « layer » repose principalement sur sa région centrale. Tous ces exemples cités ci-haut montrent que dépendamment des espèces et des régimes de sélection, les régions de l'IGS responsables de sa variation sont localisées à des endroits différents de l'IGS.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, la portion d'IGS chez la perchaude comprenant les régions R1 et R2 est la plus responsable de l'hétérogénéité de longueur. En effet, l'amplification PCR de chacune des quatre régions R1 à R4 seules ou combinées a permis de déterminer que les régions R1 et R2 (R1+R2) ensemble révélait une différence de génotypes entre les individus de perchaude. Les autres régions ne montraient aucune ou très peu de variation. Il serait intéressant de mener des analyses fonctionnelles plus poussées afin de confirmer que ce sont bien les régions R1 et R2 qui influencent le plus la transcription des gènes d'ARNr car, bien que de part leur nature répétitive, on peut supposer que R1 et R2 sont des régions abritant des éléments régulateurs de la transcription, il y a aussi les autres régions R3 et R4 qui contiennent elles aussi des répétitions et sont donc susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr. Il serait donc important de confirmer que par rapport à R3 et R4, R1 et R2 sont principalement responsable de l'hétérogénéité de longueur de l'IGS.

Comme pour tout les autres IGS, celui de la perchaude possède des séquences qui ont une implication fonctionnelle dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr. Ces séquences incluent des homopolymères poly (dA).(dT) qui sont retrouvés principalement dans R1 et entre R2 et R3. À l'intérieur des IGS de certains eucaryotes, la présence de tels poly (dA).(dT) est associée à la formation d'une boucle spécifique d'ADN qui facilite l'accès des facteurs de transcription aux éléments cis-régulateurs (Anderson & Widom 2001, Koch & Thiele 1999). Ces poly (dA).(dT) sont des sites de liaison des facteurs de transcription (Winter and Varshavsky 1989), ils sont également considérés comme étant des enhancers pour la transcription des gènes et sont reconnus comme éléments promoteurs chez la levure (Struhl 1985, Suter *et al.* 2000, Winter & Varshavsky 1989). Pour finir, on a retrouvé de tels polymères proches des enhancers chez les eucaryotes (Moss & Stefanovsky 1995).

Étant donné toutes les caractéristiques de ces polymères, il est probable que les poly (dA).(dT) présents dans l'IGS de la perchaude jouent un rôle fonctionnel important dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr comme c'est le cas pour les autres eucaryotes. D'autres éléments fonctionnels importants retrouvés au sein de l'IGS sont les îlots CpG localisés dans R3, R4 et également en aval de R4. Ces îlots CpG participent à la régulation épigénétique de la transcription via leur statut de méthylation (Groenbaek *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que chez les vertébrés, les « housekeeping genes » dont font partie les gènes d'ARNr, sont associés à des îlots CpG hypométhylés (Gardiner-Garden & Frommer 1987). Aussi, la méthylation des îlots CpG au niveau de promoteurs de gènes a été associée au « gene silencing » tandis que leur hypométhylation est associée à l'activation des gènes. Ainsi, il a été démontré que les régions d'ADNr hyperméthylées ne participaient pas à la régulation de la transcription des gènes d'ARNr chez la souris et l'humain (Grozdanov & Karagyozov 2002, Mason *et al.* 1997, Shiraishi *et al.* 1999). Tous ces faits suggèrent que le statut de méthylation des îlots CpG présents dans l'IGS de la perchaude joue également un rôle dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr. Pour finir, de part leur nature répétitive, tous les éléments répétitifs de l'IGS sont considérés comme étant de possibles éléments régulateurs tels que les enhancer, les spacers promoteurs, les terminators. Puisque dans

les bases de données publiques, la recherche de similitude entre les séquences consensus de ces éléments régulateurs et les éléments répétitifs de l'IGS de perchaude n'a donné aucun résultat, on ne peut que supposer que ces éléments sont également des éléments régulateurs de la transcription des gènes d'ARNr juste de part leur nature répétitive.

Afin de mieux comprendre les implications fonctionnelles de ces différents éléments répétitifs de l'IGS de perchaude, il faudrait réaliser des analyses fonctionnelles plus poussées comme perspective future. Pour réaliser ce genre de test, une des analyses les plus courantes consiste à utiliser un gène rapporteur; cette technique basée sur le clonage de gènes permet de localiser principalement le promoteur mais également d'autres éléments régulateurs et leurs facteurs de transcription (Dale & Von Schantz 2007). Ainsi, chacun des éléments répétitifs de l'IGS de perchaude peuvent être insérés proche d'un gène rapporteur à l'intérieur d'un vecteur d'expression (plasmide par exemple). Ce vecteur sera ensuite introduit dans un organisme où on pourra détecter et quantifier l'expression du gène rapporteur. De cette manière, on sera capable d'identifier les éléments de l'IGS impliqués dans la transcription. Par exemple, si ces éléments sont des enhancers, le gène rapporteur sera exprimé plus intensément. Par contre, si ces éléments ne jouent aucun rôle dans la transcription, on n'observera aucune expression. Par exemple, pour identifier un promoteur, on insère la séquence à l'étude dans un vecteur dépourvu de promoteur; ce vecteur appelé « *promoter probe vector* » permettra l'expression du gène rapporteur seulement si la séquence insérée est un promoteur, sinon il n'y aura aucune expression. Pour révéler la fonction des éléments répétitifs de l'IGS, les chercheurs ont également recouru à des essais de transcription *in vitro* mais, il faudrait connaître au préalable les facteurs de transcription qui se lient aux éléments qu'on veut étudier. En effet, en ce qui concerne l'IGS, les facteurs de transcriptions sont spécifiques à une espèce; ce qui rend difficile l'identification des éléments régulateurs d'un IGS sans en connaître les facteurs de transcription. Ces techniques décrites plus haut et plusieurs autres de leurs variantes peuvent être utilisées dans des études ultérieures afin de déterminer plus précisément le rôle de chacun des éléments répétitifs de l'IGS de perchaude. Même si les facteurs de transcriptions spécifiques de l'IGS de la

perchaude n'ont pas encore été isolés, la connaissance de la séquence et de la structure de l'IGS de perchaude constitue un bon départ pour ce genre d'études fonctionnelles.

Taux de croissance et importance fonctionnelle du polymorphisme de longueur d'IGS

Des études ont révélé que la sélection pour un taux de développement élevé favorisait les individus ayant les plus longs IGS donc possédant un plus grand nombre de répétitions dans leur IGS. La sélection naturelle ou artificielle pour un taux de croissance particulier permet donc aux espèces de s'adapter à leur milieu en modifiant le nombre de répétitions présents dans l'IGS. C'est ainsi que des études réalisées sur les invertébrés, *Drosophila melanogaster* (Cluster *et al.* 1987, Grimaldi & Di Nocera 1988) et *Daphnia pulex* (Gorokhova *et al.* 2002), ont démontré l'effet de la sélection artificielle pour un taux de croissance sur la prédominance de longueurs précises d'IGS chez les descendants. Ainsi, dans les lignées à développement rapide, prédominaient les individus à longs IGS alors que les lignées à développement lent étaient majoritairement formées d'individus à plus courts IGS. Des études réalisées cette fois-ci chez les plantes ont également montré que la sélection a pour conséquence de modifier la structure de l'ADNr en agissant sur les longueurs d'IGS. Par exemple, les travaux de Rocheford *et al.* (1990); Kaufmann *et al.* (1996) ont mis en évidence que la sélection sur les rendements de culture de maïs causait une prédominance des plus longs IGS dans certaines souches de maïs. Dans notre étude, les populations de perchaudes du LSP pourraient avoir subi une sélection favorisant une longueur donnée d'IGS car ces populations évoluent dans des environnements assez différents. En effet, les rives nord et sud du LSP offrent des conditions de croissance contrastante à cause de leur différence de masses d'eau, de disponibilité en nutriments et de turbidité (Frenette *et al.* 2006).

Trois principaux génotypes ont émergés à la suite de l'amplification de la région contenant R1 et R2; ce sont les génotypes « long », « long et court », « court ». Le génotype « long » regroupe les fragments amplifiés entre 2.3 kb et 2 kb; le « court » regroupe les fragments dont la taille est inférieure ou égale à 1.5 kb; le « long et court »

regroupe les patrons d'amplification dont les bandes contiennent à la fois des fragments dont la taille est inférieure ou égale à 1.5kb et également des fragments dans les intervalles 2.3 kb-2 kb. On s'attendait à ce que les génotypes d'IGS « long » soient majoritaires dans la population sud qui exhibait un taux de croissance (indice LT) plus élevé; par contre, les génotypes « courts » et « long et courts » devaient être représentés en majorité dans la population nord qui a un taux de croissance (indice LT) plus bas. Hors, les fréquences des trois génotypes sont similaires dans les populations des deux rives; ces résultats de distribution de génotypes entre les rives suggèrent qu'il n'existe qu'une seule population de perchaude dans le LSP au lieu de deux populations distinctes comme on le pensait précédemment. Leclerc *et al.* (2007) est arrivée à la même conclusion dans une étude portant sur la différenciation des populations de perchaude retrouvées dans le Fleuve St. Laurent ou des marqueurs neutres de types microsatellites ont été employés. D'après leurs résultats, le LSP ne présente qu'une seule population de perchaude. Tout de même, l'étude de Leclerc *et al.* (2007) ne pouvait révéler une adaptation locale vu qu'un marqueur neutre par définition implique une évolution en absence de sélection naturelle. Il reste que l'existence de deux populations distinctes dans le LSP est plausible étant donné la restriction des mouvements latéraux entre les rives à cause de la présence de courant d'eau très forts et d'un chenal maritime.

Les perchaudes provenant de la rive sud avaient une longueur totale plus élevée que celles de la rive nord suggérant une croissance plus élevée sur la rive sud. Par contre l'indice de croissance à court-terme (rapport ARN/ADN) était non significatif entre les rives. Des études précédemment réalisées sur les larves de perchaudes (Tardif *et al.* 2005) ainsi que sur des stades plus avancés (Glémet & Rodriguez 2007) ont mis en évidence l'existence de longueurs totales différentes selon que les perchaudes se trouvaient sur l'une des deux rives du LSP. Ces différences suggéraient que les perchaudes de la rive sud avaient un taux de croissance plus élevé que celles de la rive nord. Dans notre étude le manque de cohérence entre les deux indices de croissance (LT et rapport ARN/ADN) reflète probablement leurs temps de réponse distincts. En effet, le rapport ARN/ADN permet d'évaluer la croissance à court terme en réponse aux conditions de nourriture ou de température il y a 3-7 jours tandis que la LT représente la

croissance accumulée tout au long de la vie d'un individu. Il est possible qu'au temps de capture, les conditions pour la croissance récente étaient semblables entre les rives expliquant ainsi un rapport ARN\ADN semblable pour les populations de la rive sud et nord.

D'après la distribution similaire des génotypes entre les deux rives, il semblerait que la différence de LT observée entre les deux populations ne soit pas en lien avec le polymorphisme d'IGS. Deux facteurs majeurs pourraient être à l'origine des résultats qui donnent un manque de corrélation entre longueur des IGS. Tout d'abord, au sein de chaque rive, il existe une hétérogénéité spatiale marquée de conditions environnementales de l'amont à l'aval (Frenette *et al.* 2006) résultant en un gradient horizontal de conditions pour la croissance, ce qui pourrait mener à des sous-populations de perchaudes. Les perchaudes utilisées dans notre étude étaient à des stades de vie avancés au cours desquelles leur mobilité entraîne un mélange horizontal qui peut aboutir à l'homogénéisation des sous-populations. De plus, ces perchaudes ne proviennent pas de sites particuliers mais elles ont été capturées au hasard le long des rives. Donc, il se pourrait qu'au niveau de chaque rive, la fréquence des génotypes de perchaudes n'était pas représentative de l'adaptation locale des sous-populations. Pour des études futures, une possibilité serait de procéder à une analyse spatiale plus exhaustive le long de chaque rive. Il serait également très intéressant de faire ultérieurement des analyses sur les jeunes stades de perchaudes moins mobiles au niveau des quatre principaux sites de fraie; soit les sites Maskinongé, Yamachiche sur la rive nord et Anse du fort, Longue Pointe sur la rive sud. Ceci minimisera la possibilité de mélange horizontal le long des rives et pourrait révéler plus justement la fréquence des génotypes résultant d'adaptations locales. Enfin, des études réalisées chez des individus de perchaude de même âge élevés en laboratoire pourraient nous permettre de vérifier l'effet de chacun des génotypes sur le taux de croissance.

Une autre possibilité est que les perchaudes de la rive sud affichent une longueur totale plus élevée car ils sont plus âgés. Afin d'obtenir une estimation plus précise de la croissance des poissons, on pourrait faire une analyse des opercules de chaque poisson.

Ces structures présentent des anneaux dont l'observation permet de déterminer l'âge et la croissance annuelle (Le Cren 1947). Cette méthode pourrait ainsi révéler si un avantage de croissance a eu lieu ultérieurement durant la vie de la perchaude, par exemple durant la première année de croissance.

En conclusion, notre étude a permis de développer un marqueur moléculaire permettant de révéler un polymorphisme de longueur des IGS de la perchaude. Il s'agit du premier marqueur basé sur l'hétérogénéité de longueur des IGS chez les poissons. La structure de l'IGS de perchaude est similaire à celle de nombreux IGS d'eucaryotes. Cet IGS comprend des séquences répétées en tandem qui sont probablement des éléments régulateurs de la transcription de l'ADNr. L'amplification des régions R1 et R2 combinée a révélé l'existence d'un polymorphisme d'IGS chez les populations de perchaude du LSP. Trois principaux génotypes d'IGS ont alors été trouvés dans ces populations; soit le génotype « long » représenté par un fragment amplifié de 2,5 kb, le génotype « court » représenté par un fragment de 1,5 kb et le génotype « long et court » contenant les deux fragments de 2,5 kb et 1,5 kb.

Afin de révéler l'importance fonctionnelle de ce polymorphisme, on a évalué l'existence d'une corrélation entre longueur des IGS et taux de croissance chez deux populations naturelles de perchaudes provenant des rives nord et sud du LSP. Nous avons utilisé deux indices de croissance soit le rapport ARN/ADN et la longueur totale mais seulement la LT différait entre les populations. La LT indiquait donc que la population de la rive sud exhibait un taux de croissance plus élevé que celle de la rive nord. Néanmoins, cette différence n'est pas en lien avec les longueurs d'IGS car le patron de distribution des fréquences des génotypes est similaire dans les deux populations même si on s'attendait à retrouver plus d'individus à génotype « long » dans la population sud (ayant la LT plus élevée). Notre étude a été effectuée sur des perchaudes à des stades de développement plus avancés et donc plus mobiles. Cette mobilité des perchaudes analysées a pu aboutir à l'homogénéisation des sous-populations le long des rives; de telle sorte que nos analyses n'ont pas pu mettre en valeur la structuration des populations de perchaudes. Cette hypothèse était légitime car

les conditions de croissance contrastantes sur les deux rives du LSP et la présence de courant d'eaux très forts auraient empêché d'une part le mélange vertical des poissons et d'autre part auraient créé des environnements très différents sur les deux rives. Par conséquent, ces facteurs environnementaux auraient pu exercer une sélection ayant pour conséquence de favoriser des longueurs particulières d'IGS. Néanmoins, d'après nos résultats, on a conclu que malgré les facteurs de sélection évoqués plus haut, il n'existe qu'une seule population de perchaude dans le LSP au lieu de deux.

Comme perspectives futures, on pourrait tout d'abord estimer l'âge des perchaudes étudiées. Pour ce faire, on réaliserait la même étude sur des individus de même âge élevés en laboratoire ou encore sur des larves de perchaudes capturées au niveau des sites de fraies. Des analyses fonctionnelles plus poussées pourraient également être réalisées afin de déterminer l'implication réelle des différentes régions de l'IGS de perchaudes dans le contrôle du taux de transcription de l'ADNr. Ces analyses permettront d'évaluer les régions qui doivent être prises en compte pour établir l'importance du polymorphisme d'IGS sur le taux de croissance des perchaudes.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, J. D., & Widom, J. (2001). Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Mol Cell Biol*, 21(11), 3830-3839.
- Arnheim, N., Treco, D., Taylor, B., & Eicher, E. M. (1982). Distribution of ribosomal gene length variants among mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(15), 4677-4680.
- Baldrige, G. D., & Fallon, A. M. (1992). Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus*. *DNA Cell Biol*, 11(1), 51-59.
- Banditt, M., Koller, T., & Sogo, J. M. (1999). Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*, 19(7), 4953-4960.
- Beebee, T.J.C., and Rowe, G. (2004). Molecular and adaptive variation. In. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press. pp. 145-164.
- Benson, G. (1999). *Tandem Repeats Finder*, from <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>
- Boseley, P., Moss, T., Machler, M., Portmann, R., & Birnstiel, M. (1979). Sequence organization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of *Xenopus laevis*. *Cell*, 17(1), 19-31.
- Busby, S. J., & Reeder, R. H. (1983). Spacer sequences regulate transcription of ribosomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell*, 34(3), 989-996.
- Butler, B., & Doers, M. (1995). Generation of Nested Deletions using the Erase-A-Base® System. *Promega Notes*, 53, 36-38.
- Castro, J., De Lucchini, S., Nardi, I., Sanchez, L., & Martinez, P. (1997). Molecular analysis of a NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*): organization of rDNA intergenic spacers. *Genome*, 40(6), 916-922.
- Caudy, A. A., & Pikaard, C. S. (2002). *Xenopus* ribosomal RNA gene intergenic spacer elements conferring transcriptional enhancement and nucleolar dominance-like competition in oocytes. *J Biol Chem*, 277(35), 31577-31584.
- Chen, Z. J., & Pikaard, C. S. (1997). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev.*, 11(16), 2124-2136.

- Cluster, P. D., Marinkovic, D., Allard, R. W., & Ayala, F. J. (1987). Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(2), 610-614.
- Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T., & Sogo, J. M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, 57(5), 753-761.
- Crease, T. J. (1993). Sequence of the intergenic spacer between the 28S and 18S rRNA-encoding genes of the crustacean, *Daphnia pulex*. *Gene*, 134(2), 245-249.
- Dale, J. W., & Von Schantz, M. (2007). In *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*: John Wiley & Sons Inc.
- D'Alessio, J. M., Harris, G. H., Perna, P. J., & Paule, M. R. (1981). Ribosomal ribonucleic acid repeat unit of *Acanthamoeba castellanii*: cloning and restriction endonuclease map. *Biochemistry*, 20(13), 3822-3827.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., & Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 21(10), 2331-2338.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., & Sogo, J. M. (1995). Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol*, 15(10), 5294-5303.
- Delany, M. E., & Krupkin, A. B. (1999). Molecular characterization of ribosomal gene variation within and among NORs segregating in specialized populations of chicken. *Genome*, 42(1), 60-71.
- Diedrich, G., Spahn, C. M., Stelzl, U., Schafer, M. A., Wooten, T., Bochkariov, D. E., Cooperman, B. S., Traut, R. R., & Nierhaus, K. H. (2000). Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *EMBO J.*, 19(19), 5241-5250.
- Dover, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 299(5879), 111-117.
- Eberharter, A., & Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.*, 3(3), 224-229.
- Elder, J. F., Jr., & Turner, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.*, 70(3), 297-320.
- Elgin, S. C. (1988). The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J. Biol. Chem.*, 263(36), 19259-19262.

- Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., Harrison, J. F., Hobbie, S. E., Odell, G. M., & Weider, L. J. (2000). Biological Stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, 3, 540-550.
- Fahy, D., Conconi, A., & Smerdon, M. J. (2005). Rapid changes in transcription and chromatin structure of ribosomal genes in yeast during growth phase transitions. *Exp. Cell. Res.*, 305(2), 365-373.
- Flavell, R. B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312(1154), 227-242.
- Flavell, R. B., O'Dell, M., & Thompson, W. F. (1988). Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. *J Mol Biol*, 204(3), 523-534.
- Frenette, J. J., Arts, M. T., Morin, J., Gratton, D. & Martin, C. 2006. Hydrodynamic control of the underwater light climate in fluvial Lac Saint-Pierre. *Limnol Oceanogr*, 51(6), 2632-45.
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2), 261-282.
- Ghoshal, K., Majumder, S., Datta, J., Motiwala, T., Bai, S., Sharma, S. M., Frankel, W., & Jacob, S. T. (2004). Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression. *J Biol Chem*, 279(8), 6783-6793.
- Glémet, H. & Rodríguez, M.A. (2007). Short-term growth (RNA/DNA ratio) of yellow perch in relation to environmental influences and spatio-temporal variation in a shallow fluvial lake. *Can j Fish Aquat Sci*, 64(12), 1646-1655.
- Goldman, W. E., Goldberg, G., Bowman, L. H., Steinmetz, D., & Schlessinger, D. (1983). Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol Cell Biol*, 3(8), 1488-1500.
- Gorokhova, E., Dowling, T. E., Weider, L. J., Crease, T. J., & Elser, J. J. (2002). Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proc Biol Sci*, 269(1507), 2373-2379.
- Grimaldi, G., & Di Nocera, P. P. (1988). Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(15), 5502-5506.

- Grimaldi, G., Fiorentini, P., & Di Nocera, P. P. (1990). Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 10(9), 4667-4677.
- Gronbaek, K., Hother, C., & Jones, P. A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS*, 115, 1039-1059.
- Grozdanov, P. N., & Karagyozev, L. (2002). The mouse ribosomal DNA amplification promoting sequence 1 is highly methylated and repeated in the genome. *Z Naturforsch [C]*, 57(9-10), 897-901.
- Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I., & Rosenbauer, H. (1986). A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell*, 47(6), 901-911.
- Grummt, I., & Pikaard, C. S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol. Cell. Biol.*, 4(8), 641-649.
- Gupta, P. K., Sharma, P. K., Balyan, H. S., Roy, J. K., Sharma, S., Beharav, A., & Nevo, E. (2002). Polymorphism at rDNA loci in barley and its relation with climatic variables. *Theor Appl Genet*, 104(2-3), 473-481.
- Houchins, K., O'Dell, M., Flavell, R. B., & Gustafson, J. P. (1997). Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids. *Mol Gen Genet*, 255(3), 294-301.
- Jacob, S. T. (1995). Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochem J*, 306, 617-626.
- Ju, Q., & Warner, J. R. (1994). Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(2), 151-157.
- Khaitovich, P., Mankin, A. S., Green, R., Lancaster, L., & Noller, H. F. (1999). Characterization of functionally active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(1), 85-90.
- Kaufman, B., Rocheford, T. R., Lambert, R. J., & Hallauer, A. R. (1996). Change in ribosomal DNA spacer-length composition in maize recurrent selection populations. 2. Analysis of BS10, BS11, RBS10, and RSSSC. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 680-687.
- Koch, K. A., & Thiele, D. J. (1999). Functional analysis of a homopolymeric (dA-dT) element that provides nucleosomal access to yeast and mammalian transcription factors. *J Biol Chem*, 274(34), 23752-23760.

- Kohorn, B. D., & Rae, P. M. (1982). Nontranscribed spacer sequences promote in vitro transcription of *Drosophila* ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res*, 10(21), 6879-6886.
- Kownin, P., Iida, C. T., Brown-Shimer, S., & Paule, M. R. (1985). The ribosomal RNA promoter of *Acanthamoeba castellanii* determined by transcription in a cell-free system. *Nucleic Acids Res*, 13(17), 6237-6248.
- Kuhn, A., Deppert, U., & Grummt, I. (1990). A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19), 7527-7531.
- Kyle, M., Watts, T., Schade, J., & Elser, J. J. (2003). A microfluorometric method for quantifying RNA and DNA in terrestrial insects. *J Insect Sci*, 3, 1.
- Labhart, P., & Reeder, R. H. (1984). Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell*, 37(1), 285-289.
- LaVolpe, A., Simeone, A., D'Esposito, M., Scotto, L., Fidanza, V., Falco, A., & Boncinelli, E. (1985). Molecular analysis of the heterogeneity region of the human ribosomal spacer. *J. Mol. Biol.* 183, 213-223.
- Lawrence, R. J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z. J., Neves, N., Viegas, W., & Pikaard, C. S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell.*, 13(4), 599-609.
- Lawrence, R. J., & Pikaard, C. S. (2004). Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle*, 3(7), 880-883.
- Lawrence, R. J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z. J., Neves, N., Viegas, W., & Pikaard, C. S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell.*, 13(4), 599-609.
- Leclerc, É., Mailhot, Y., & Bernatchez, L. (2007). Définition des populations de perchaudes (*Perca flavescens*) du fleuve St-Laurent au Québec : Analyse du patron géographique de la variation génétique et morphologique: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- Le Cren, E. D. (1947). The determination of the age and growth of the Perch (*Perca fluviatilis*) from the opercular bone. *J. anim. Ecol.*, 16 : 188-204.
- Liao, D. (1999). Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.*, 64(1), 24-30.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., & Darnell, J. (2003). In *Molecular Cell Biology* (5 ed., pp. 123-125). New York: W. H. Freeman & Co.
- Lucchini, R., & Sogo, J. M. (1992). Different chromatin structures along the spacers flanking active and inactive *Xenopus* rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.*, 12(10), 4288-4296.
- Luchetti, A., Scanabissi, F., & Mantovani, B. (2006). Molecular characterization of ribosomal intergenic spacer in the tadpole shrimp *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Genome*, 49(8), 888-893.
- Majumder, S., Ghoshal, K., Datta, J., Smith, D. S., Bai, S., & Jacob, S. T. (2006). Role of DNA methyltransferases in regulation of human ribosomal RNA gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 281(31), 22062-22072.
- Marsden, E. J., & Robillard, S. R. (2004). Decline of Yellow Perch in Southwestern Lake Michigan, 1987–1997. *North Am. J. Fish. Man.*, 24(3), 952–966
- Mason, S. W., Sander, E. E., & Grummt, I. (1997). Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *EMBO J.*, 16(1), 163-172.
- Mateos, M., & Markow, T. A. (2005). Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). *BMC Evol Biol*, 5, 46.
- Mathis, D., Oudet, P., & Chambon, P. (1980). Structure of transcribing chromatin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 24, 1-55.
- Mayer, C., Schmitz, K. M., Li, J., Grummt, I., & Santoro, R. (2006). Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol. Cell.*, 22(3), 351-361.
- McKnight, S. L., & Miller, O. L., Jr. (1976). Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 8(2), 305-319.
- Miller, O. L., Jr., & Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science*, 164(882), 955-957.
- Miller, K. G., Tower, J., & Sollner-Webb, B. (1985). A complex control region of the mouse rRNA gene directs accurate initiation by RNA polymerase I. *Mol Cell Biol*, 5(3), 554-562.
- Mizzen, C. A., & Allis, C. D. (1998). Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54(1), 6-20.

- Morales-Hojas, R., Post, R. J., Cheke, R. A., & Wilson, M. D. (2002). Assessment of rDNA IGS as a molecular marker in the *Simulium damnosum* complex. *Med Vet Entomol*, 16(4), 395-403.
- Morrow, B. E., Johnson, S. P., & Warner, J. R. (1993). The rRNA enhancer regulates rRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*, 13(2), 1283-1289.
- Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 14(2), 210-217.
- Moss, T., & Stefanovsky, V. Y. (1995). Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 50, 25-66.
- Moss, T., & Stefanovsky, V. Y. (2002). At the center of eukaryotic life. *Cell*, 109(5), 545-548.
- Noller, H. F., Hoffarth, V., & Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256(5062), 1416-1419.
- Nomura, M. (2001). Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 66, 555-565.
- Paule, M.R. & Lofquist, A.K. (1996). Organization and expression of eukaryotic ribosomal RNA genes. In *Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis* (ed. R. A. Zimmerman & A. E. Dahlberg), pp. 395-420. CRC Press, New York.
- Paule, M. R. (1998). Transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes by RNA polymerase I. Springer-Verlag New York Inc., New York, N.Y.
- Pelan, S. (2004). *Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 14, complete sequence.*, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
- Pikaard, C. S., Pape, L. K., Henderson, S. H., Ryan, K., Paalman, M. H., Lopata, M.A., Reeder, R. H. & Sollner-Webb, B. (1990). Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol*, 10, 4816-4825.
- Preuss, S., & Pikaard, C. S. (2007). rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1769(5-6), 383-392.
- Ramakrishnan, V., & White, S. W. (1998). Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends. Biochem. Sci.*, 23(6), 208-212.

- Reed, K. M., & Phillips, R. B. (2000). Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Chromosome Res*, 8(1), 5-16.
- Reeder, R. H. (1984). Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell*, 38(2), 349-351.
- Reeder, R. H. (1989). Regulatory elements of the generic ribosomal gene. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1(3), 466-474.
- Reeder, R. H. (1990). rRNA synthesis in the nucleolus. *TIG* 6, 390-395
- Reeder, R. H., Roan, J. G., & Dunaway, M. (1983). Spacer regulation of *Xenopus* ribosomal gene transcription: competition in oocytes. *Cell*, 35, 449-456.
- Robert, M. F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I. C., Barsalou, A., & MacLeod, A. R. (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*, 33(1), 61-65.
- Rochefford, T. R., Osterman, J.C., & Gardner, C.O. (1990). Variation in the ribosomal DNA intergenic spacer of a maize population mass-selected for high grain yield. *Theor. Appl. Genet.*, 79, 793-800.
- Rodnina, M. V., Beringer, M., & Wintermeyer, W. (2006). Mechanism of peptide bond formation on the ribosome. *Q. Rev. Biophys.*, 39(3), 203-225.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 81-120.
- Ruggero, D., & Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer*, 3(3), 179-192.
- Ryu, S. H., Do, Y. K., Hwang, U. W., Choe, C. P., & Kim, W. (1999). Ribosomal DNA intergenic spacer of the swimming crab, *Charybdis japonica*. *J Mol Evol*, 49(6), 806-809.
- Sandmeier, J. J., French, S., Osheim, Y., Cheung, W. L., Gallo, C. M., Beyer, A. L., & Smith, J. S. (2002). RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *EMBO J.*, 21(18), 4959-4968.
- Santoro, R., & Grummt, I. (2005). Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 25(7), 2539-2546.
- Santoro, R., Li, J., & Grummt, I. (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*, 32(3), 393-396.

- Sardana, R., O'Dell, M., & Flavell, R. (1993). Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of rRNA genes and nucleolar expression in wheat. *Mol Gen Genet*, 236(2-3), 155-162.
- Schlotterer, C., & Tautz, D. (1994). Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Curr. Biol.*, 4(9), 777-783.
- Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Chuu, Y. H., & Sekiya, T. (1999). Alteration of mosaic methylation of the repeat unit of the human ribosomal RNA genes in lung cancer. *Biol Chem*, 380(1), 81-84.
- Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., & Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol. Cell.*, 8(5), 1063-1073.
- Struhl, K. (1985). Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24), 8419-8423.
- Suter, B., Schnappauf, G., & Thoma, F. (2000). Poly(dA.dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 28(21), 4083-4089.
- Suzuki, M., Sunaga, N., Shames, D. S., Toyooka, S., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (2004). RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res.*, 64(9), 3137-3143.
- Tardif, D., Glémet, H., Brodeur, P., & Mingelbier, M. (2005). RNA/DNA ratio and total length of yellow perch (*Perca flavescens*) in managed and natural wetlands of a large fluvial lake. *Can j Fish Aquat Sci*, 62(10), 2211-2218.
- Waldron, C. (1977). Synthesis of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast during a nutritional shift-up. *J. Gen. Microbiol.*, 98(1), 215-221.
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends. Biochem. Sci.*, 24(11), 437-440.
- Watts, T., Woods, H. A., Hargand, S., Elser, J. J., & Markow, T. A. (2006). Biological stoichiometry of growth in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 52(2), 187-193.

- Weider, L. J., Glenn, K. L., Kyle, M., & Elser, J. J. (2004). Associations among ribosomal (r)DNA intergenic spacer length, growth rate, and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1417–1423.
- Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B., & Markow, T. A. (2005). THE FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF RIBOSOMAL (r)DNA VARIATION: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms. *Annu Rev Ecol Syst*, 36, 219-242.
- Winter, E., & Varshavsky, A. (1989). A DNA binding protein that recognizes oligo(dA).oligo(dT) tracts. *EMBO J*, 8(6), 1867-1877.
- Wu, C. C., & Fallon, A. M. (1998). Analysis of a ribosomal DNA intergenic spacer region from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 7(1), 19-29.
- Zhou, Y., Santoro, R., & Grummt, I. (2002). The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J.*, 21(17), 4632-4640.
- Zhuo, L., Reed, K. M., & Phillips, R. B. (1995). Hypervariability of ribosomal DNA at multiple chromosomal sites in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Genome*, 38(3), 487-496