

Thèse présentée par

Alexandre Tremeau-Bravard

pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Etude fonctionnelle de TFIIH et des mécanismes de
transcription et de réparation de l'ADN**

Soutenue publiquement le 30 Avril 2004 devant le jury composé de :

Rapporteurs Externes : Mr. Pierre Jalinot, Docteur, Lyon.
Mr. Alain Sarasin, Docteur, Paris.
Rapporteur Interne : Mr. Claude Kedinger, Professeur des Universités, Strasbourg.
Directeur de Thèse : Mr. Jean-Marc Egly, Docteur, Strasbourg.

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Pierre Jalinot, Claude Kedinger et Alain Sarasin d'avoir bien voulu évaluer mon travail de thèse.

Je remercie Jean-Marc Egly de m'avoir accepté dans son laboratoire durant ces années de recherche et d'avoir cru en moi. Je le remercie également de m'avoir permis d'effectuer mon stage de volontariat dans le laboratoire de Michael Dahmus.

Je remercie Michael Dahmus de m'avoir accepté dans son laboratoire durant mon volontariat international. Sa gentillesse et son esprit scientifique m'auront aidé tout au long de ces deux années. Je remercie également Grace Dahmus de sa gentillesse et de son aide technique.

Je remercie tous les membres des services communs de l'IGBMC et en particulier Isabelle et Jean-Luc pour tous leurs baculovirus.

Je remercie tous les anciens membres et les membres actuels de l'équipe et de l'institut, et en particulier : Fabrice que j'admire, Anne pour son amitié, Etienne pour son soutien moral et son amitié, Frédéric pour m'avoir suivi et supporté lors de mes premiers pas dans la recherche, Annabel et Cathy pour leur patience et leur aide, Marc pour ses TFIIH, Christophe pour sa pêche, Philippe pour ses paris et ses tablettes de choc, Thierry pour son fromage, Valérie pour ses gâteaux et ses services rendus, Franck pour sa rigueur, Sandy pour sa motivation, Jérôme pour son humour, Thilo pour son originalité, John pour son expertise, Björn, Jean-Philippe, Jean-Christophe (les 2), Mireille, Anne, Manu, Bruno et tous les autres à qui je pense mais que je ne cite pas.

Je remercie tous mes amis d'Alsace (Guillaume, Clem, Renaud...), de Bourgogne (Ben, JB, Tom/Tiphaine, François, Eric, Marion, Pom, Lolo, Jéré...), de Bretagne (Patrick/Armelle, Erwan, Nono, Sébish, Lolotte, Barnet...), de Californie (Phil/Caro, Taïbou/Carla, Flo/Julia, Jean-Mi/Nanon, Chris/Sarah, Pie/Ju, Gerrit, Pat/Christine, Boynarr, Mag/Jose...) et d'ailleurs, qui m'ont permis d'avancer et de m'accrocher. Je n'oublie pas ma grand-mère et mes proches disparus trop tôt (Olivier, Georges, Julien, Laurent et Seb).

Un grand merci aux personnes qui m'ont aidé pour la rédaction de ce manuscrit (Ben, Elsa, Frédérique, Fab, Mag, Etienne, mon père, ma mère et ma sœur).

Ma sœur, mes frères, mon sincou, ma famille, Camille et Elsa : LOVE IS ALL !

Une pensée particulière pour Blanche qui aura été, durant toute ma thèse, à la fois mon gouvernail et ma grand-voile.

Finalement, et il va sans dire, je dédie cette thèse à mon père et ma mère sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

SOMMAIRE

Abréviations	3
Liste des tableaux et figures	4
Avant-propos	5
Chapitre I : Transcription des gènes de classe II	7
1. Les séquences régulatrices de l'ADN	8
1.1 Le promoteur minimal	8
1.2 Les éléments de régulation	10
a) Les séquences régulatrices proximales	10
b) Les séquences régulatrices distales	11
2. Les facteurs généraux de la transcription	11
2.1 TFIID	12
2.2 TFIIB	14
2.3 TFIIF	15
2.4 TFIIE	15
2.5 TFIIA	16
3. L'ARN polymérase II eucaryote	16
3.1 Structure de l'ARNP II	17
3.2 Le CTD : structure et fonction (publication 1)	19
4. Les étapes de la transcription	31
4.1 L'initiation	31
a) Formation du PIC et holoenzyme	31
b) Ouverture de l'ADN et échappée du promoteur	33
4.2 L'élongation	36
4.3 La terminaison	38
5. La transcription dans un contexte chromatinien	39
5.1 Structure de la chromatine	39
5.2 Modification de la chromatine	41
a) Acétylation-désacétylation	42
b) Phosphorylation, ubiquitinylation, méthylation	45
c) Modifications non covalentes de la chromatine	46
6. La régulation de la transcription	47
6.1 Les activateurs	47
6.2 Les répresseurs	49
Chapitre II : Réparation de l'ADN par excision de nucléotides	51
1. Mécanisme moléculaire de la NER	52
1.1 Lésions reconnues par la NER	52
1.2 Les étapes de la NER et les facteurs associés	54
a) La double incision	56
b) La resynthèse	59

2. La transcription couplée à la réparation (TCR)	59
3. La NER dans un contexte chromatinien	63
4. Les syndromes liés à la NER	65
4.1 Le <i>Xeroderma pigmentosum</i>	65
4.2 Le syndrome de Cockayne	68
4.3 La trichothiodystrophie	69
Chapitre III: TFIIH: un facteur multifonctionnel	71
1. Les sous-unités de TFIIH	71
1.1 Le cœur de TFIIH et XPD	72
1.2 Le sous complexe CAK	76
2. Structure tridimensionnelle de TFIIH	78
3. Fonctions de TFIIH au sein de la cellule	79
3.1 TFIIH et la transcription des gènes de classe II	79
3.2 TFIIH et la transcription des gènes de classe I	80
3.3 TFIIH et la NER	81
3.4 TFIIH et le cycle cellulaire	81
3.5 TFIIH et l'apoptose	82
Résultats	84
Publication 2: Des mutations dans XPB et XPD, retrouvées chez des patients atteints de <i>Xeroderma pigmentosum</i> , dérégulent l'activité de transcription de TFIIH	84
Publication 3: Rôle de la partie carboxy-terminale de p44 dans l'activité d'échappée du promoteur de TFIIH	95
Publication 4: Devenir de l'ARNP II bloquée sur une lésion cisplatine	101
Discussion	111
1. p44 protéine clef au sein de TFIIH	111
2. L'ARNP II signal du mécanisme de TCR	114
3. La microscopie et la biologie	117
Références	120
Liste des publications	137

ABREVIATIONS

6-4PP :	photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique
ARN :	acide ribonucléique
ARNP II	ARN polymérase de classe II
BER	réparation par excision de bases
BRE	élément de reconnaissance par TFIIB
CAK :	kinase activant les cdk
CPD	dimère de pyrimidine (<i>cyclobutane pyrimidine dimer</i>)
Cdk	kinase dépendante des cyclines
CS :	syndrome de Cockayne
CTD :	domaine carboxy-terminal de la grande sous-unité de l'ARNP II
DPE	élément en aval (<i>downstream promoter element</i>)
FRC	facteur de remodelage de la chromatine
GFP	protéine fluorescente verte (<i>green fluorescent protein</i>)
GGR	réparation globale du génome
GTF :	facteur général de transcription
HAT :	histone acétyltransférase
HDAC	histone désacétylase
HMT	histone méthyltransférase
Inr :	élément initiateur
kDa :	kiloDalton
MAT1 :	ménage à trois 1
NER :	réparation par excision de nucléotides
PCAF :	facteur associé à p300/CBP
PIC	complexe de pré-initiation de la transcription
P-TEFb :	facteur d'élongation de la transcription b
RPA :	protéine de la réplication A
SAGA :	<i>Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase</i>
SRB :	suppresseur de l'ARN polymérase B
SSL1 :	<i>suppressor of stem loop 1</i>
TAFII :	facteur de classe II associé à la TBP
TBP :	protéine de liaison à la boîte TATA (<i>TATA binding protein</i>)
TCR :	réparation couplée à la transcription
TFII :	facteur de transcription de classe II
TFTC	complexe de TAF sans TBP (<i>TBP-free TAF containing complex</i>)
TRF	facteur homologue à TBP (<i>TBP related factor</i>)
TTD :	trichothiodystrophie
UDS	synthèse d'ADN non programmée (<i>unscheduled DNA synthesis</i>)
UV :	ultra-violet
XP :	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Chapitre I: Transcription des gènes de classe II

Figure 1: Structure d'un gène	8
Figure 2: Structure du promoteur minimal	9
Tableau 1: Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription	12
Figure 3: Structure cristallographique de TBP sur l'ADN	13
Tableau 2: Composition et propriétés de l'ARNP II de levure	17
Figure 4: Structure cristallographique de l'ARNP II de levure	18
Figure 5: Formation du complexe de pré-initiation	32
Figure 6: Les différentes étapes de l'initiation de la transcription	35
Figure 7: Mécanisme de pause et d'arrêt de l'ARNP II lors de l'élongation	37
Figure 8: Le nucléosome	40
Figure 9 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN	41
Figure 10 : Modifications covalentes des histones	42
Tableau 3: Complexes HAT humains	44
Figure 11 : Mode d'action des activateurs de la transcription	48

Chapitre II: Réparation de l'ADN par excision de nucléotides

Figure 12: Les différents mécanismes de réparation de l'ADN	52
Figure 13: Exemples de lésions réparées par NER	53
Tableau 4: Facteurs humains nécessaires à la double incision	55
Figure 14: Les différentes étapes de la NER	56
Figure 15: Modèle de réparation couplée à la transcription	60
Figure 16: Différents modèles de déplacement de l'ARNP II durant la TCR	61
Figure 17: Modèle de NER dans un contexte chromatinien	64
Tableau 5: Les différents groupes de complémentation des syndromes XP, CS et TTD	65
Tableau 6: Symptômes associés aux syndromes XP, CS et TTD	66

Chapitre III: TFIIH: un facteur multifonctionnel

Figure 18: Composition et fonctions des sous-unités de TFIIH	72
Figure 19: Mutations et domaines de la protéine XPB	73
Figure 20: Mutations causales et domaine de la protéine XPD	73
Figure 21: Motifs structuraux et organisation chromosomique de p44	75
Figure 22: Architecture moléculaire de TFIIH d'homme et de levure	78

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

La cellule doit réguler de façon précise, dans l'espace et dans le temps, l'expression de son information génétique. Elle doit aussi être capable de réparer toute lésion causée à son ADN lorsque celui-ci subit des agressions environnementales ou dues au métabolisme cellulaire. En effet, des mécanismes sophistiqués de réparation de l'ADN ont été mis au point par la cellule pour lutter contre ces agressions et permettre la propagation d'une copie conforme de son information génétique aux générations futures (cellule fille). Un facteur clef intervient au cœur de ces deux processus fondamentaux : le facteur général de transcription TFIIH. L'enzyme responsable de la synthèse du transcrite (ARN), l'ARN polymérase II (ARNP II), joue aussi un rôle clef dans le couplage de la transcription à la réparation.

La transcription des gènes de classe II, codant essentiellement pour les protéines, fait intervenir 6 facteurs dit généraux de la transcription (TFIIA, B, D, E, F et H). Chacun de ces facteurs, possédant une activité transcriptionnelle dite de base, jouent un rôle précis au cours des différentes étapes de la transcription qui sont : la reconnaissance du promoteur, l'ouverture de l'ADN autour du site d'initiation, l'échappée du promoteur, l'élongation et enfin la terminaison de la transcription. Chacune de ces étapes peut être régulée finement par l'action d'une myriade de protéines nommées activateurs et répresseurs de la transcription. L'ARNP II peut rencontrer au cours de l'élongation du transcrite de nombreux obstacles dont des adduits distordant l'ADN. Ces adduits, extrêmement nocifs pour la cellule, doivent être enlevés au plus vite : un mécanisme tient ce rôle : la transcription couplée à la réparation (TCR). L'ARNP II se retrouve au centre de ce mécanisme dans le sens où elle est le signal pour le recrutement de la machinerie de réparation.

Au cours de mon travail doctoral, je me suis particulièrement intéressé à détailler le rôle d'une sous-unité de TFIIH : p44. Cette sous-unité joue un rôle crucial au sein de TFIIH dans le sens où elle régule de façon positive l'activité hélicase XPD. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de la partie amino-terminale de p44 qui interagit avec la partie carboxy-terminale de XPD. Un défaut d'interaction entre ces deux sous-unités, dû à des mutations dans

XPD, inhibe l'activité hélicase de cette dernière et entraîne les phénotypes observés chez les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* (XP).

J'ai été conduit à étudier, au cours de mon volontariat international, le mécanisme de réparation couplé à la transcription. Ce mécanisme, relativement bien compris chez les procaryotes, reste à être élucidé chez les eucaryotes. Un modèle propose que l'ARNP II, lorsqu'elle est arrêtée par une lésion sur l'ADN, induise le recrutement de la machinerie de réparation. Ce signal pourrait être relayé par une protéine nommée CSB, qui se retrouve mutée chez les patients atteints du syndrome de Cockayne (CS), et dont les cellules présentent un défaut de TCR.

L'objet de mon travail de thèse a été d'étudier 1) le rôle de la sous-unité p44 au sein du complexe TFIIH lors de la phase d'initiation de la transcription et 2) le devenir de l'ARNP II lorsque celle-ci rencontre une lésion lors de la phase d'élongation de la transcription. Avant d'aborder les résultats obtenus, je décrirai les mécanismes de transcription des gènes de classe II et de réparation de l'ADN en me basant sur les connaissances actuelles. Je détaillerai ensuite la structure et la fonction du facteur de transcription-réparation TFIIH.

CHAPITRE I : TRANSCRIPTION DES GENES DE CLASSE II

La transcription chez les eucaryotes est un mécanisme complexe faisant intervenir trois ARN polymérases différentes : l'ARNP I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) (excepté l'ARNr 5S) ; l'ARNP II transcrit les gènes codant pour les ARN messagers (ARNm) et les petits ARN nucléaires (ARNsn) (excepté l'ARNsn U6) ; et l'ARNP III transcrit les gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt) ainsi que pour les ARNr 5S et ARNsn U6 (Hampsey, 1998 ; Paule et White, 2000). Le mécanisme d'action et les facteurs impliqués dans la transcription des gènes de classe II seront détaillés dans ce chapitre.

La transcription des gènes codant pour les protéines est un mécanisme finement régulé faisant intervenir des facteurs généraux de la transcription (GTF) au nombre de six (TFIIA, B, D, E, F et H), et une myriade de protéines régulatrices nommées activateurs et répresseurs. Ces facteurs s'associent à des séquences régulatrices d'ADN pouvant se trouver à quelques bases du site d'initiation de la transcription aussi bien qu'à plusieurs milliers de bases. Je détaillerai dans un premier temps ces séquences régulatrices pour ensuite décrire les GTF et l'ARNP II.

La régulation de la transcription peut s'effectuer au niveau de chacune des différentes étapes de celle-ci : formation du complexe de pré-initiation, ouverture de l'ADN autour du site d'initiation, échappée de l'ARNP II du promoteur, élongation du transcrit et terminaison de la transcription. Le transcrit primaire (ARNpré-m) est aussi mûri au cours de ces différentes étapes : en effet, les gènes eucaryotes, codant pour les protéines, sont parsemés de séquences non codantes nommées introns. Celles-ci sont épissées et les séquences codantes (exons) raboutées les unes aux autres. Les extrémités 5' et 3' du transcrit subissent aussi une maturation : une coiffe est ajoutée en 5' et une succession d'adénosines en 3'. J'essaierai aussi de faire une synthèse de ces mécanismes.

1. Les séquences régulatrices de l'ADN

Ces séquences sont spécifiques de chaque gène et peuvent être classées en deux catégories (figures 1 et 2) : le promoteur minimal, correspondant aux séquences d'ADN situées immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription et les éléments de régulation proximaux (situés près du site d'initiation) ou distaux (plus éloignés, en aval comme en amont du site d'initiation) sur lesquels viennent se fixer les régulateurs de la transcription.

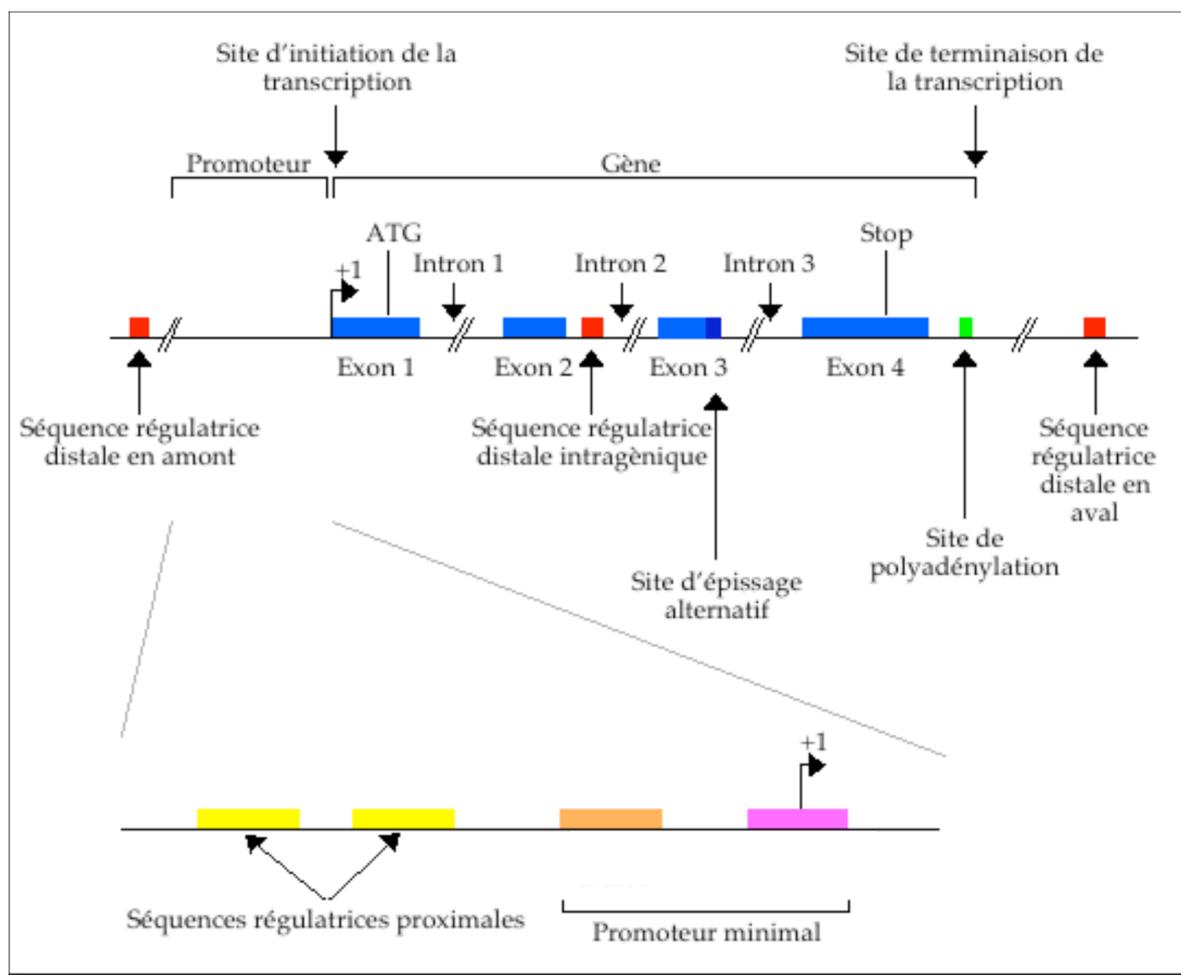


Figure 1 : Structure d'un gène.

1.1 Le promoteur minimal

Le promoteur minimal est défini comme étant la plus petite séquence d'ADN nécessaire à l'initiation de la transcription par la machinerie transcriptionnelle de l'ARNP II (Butler et Kadonaga, 2002 ; Smale et Kadonaga, 2003). En règle générale le promoteur minimal chevauche le site d'initiation de la transcription (nommé +1) pour s'étaler sur une quarantaine de

nucléotides. Il est composé de plusieurs motifs communs : la boîte TATA, l'initiateur (Inr), l'élément de reconnaissance par TFIIB (BRE) et l'élément en aval (DPE) (figure 2). Il faut pourtant préciser que tous les promoteurs ne contiennent pas tous ces éléments consensus ; un ou plusieurs sont nécessaires à la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) (voir section I.4).

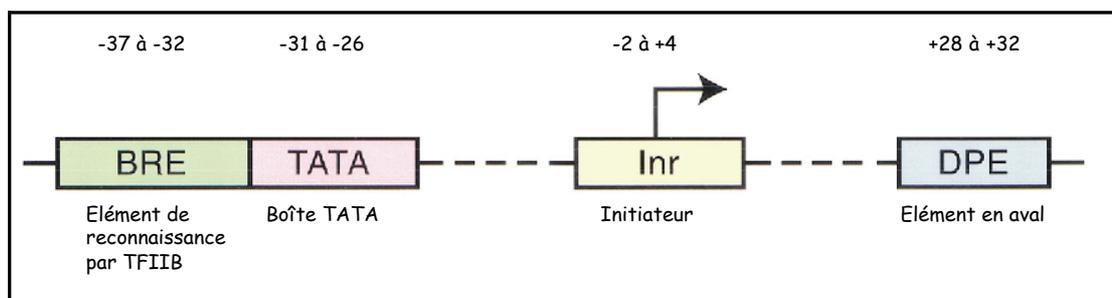


Figure 2 : Structure du promoteur minimal.

La boîte TATA fut le premier élément du promoteur minimal à être identifiée chez les eucaryotes (Breathnach et Chambon, 1981). La séquence consensus est TATA(A/T)A(A/T), et se trouve à environ une trentaine de paires de bases (jusqu'à 120 pb chez la levure) en amont du site d'initiation. Cette séquence est reconnue par la machinerie transcriptionnelle via la sous-unité TBP (pour *TATA Binding Protein*) du facteur de transcription TFIID. Bien que la TBP semble être la protéine principale liant la boîte TATA, des facteurs homologues à TBP (TRF pour *TBP related factor*) peuvent également remplir ce rôle ; il en existe au moins un chez l'homme (TRF2) (Berk, 2000). La boîte TATA pourrait également jouer un rôle dans la détermination du sens de la transcription (O'Shea-Greenfield et Smale, 1992). Cependant, ce mécanisme semble plus dû à l'action concertée de tous les éléments du promoteur. La boîte TATA semble dictée, par l'intermédiaire de TFIIB et l'ARNP II, le site d'initiation de la transcription. Son rôle prépondérant dans l'élément du promoteur est démontré par le fait qu'elle se retrouve chez presque tous les animaux, plantes et champignons examinés à ce jour.

L'élément Inr est situé autour du site d'initiation et est constitué d'une séquence riche en pyrimidines (PyPyCAPyPyPyPy ou PyPyAN(T/A)PyPy) moins conservée que la TATA. Il permet la transcription des gènes qui ne contiennent pas de boîte TATA, bien que l'on puisse également le retrouver en conjonction avec celle-ci et, dans ce cas, ces deux éléments pourraient agir en synergie (Emami *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs peuvent lier l'Inr : les sous-unités TAFII150 et TAFII250 de TFIID, l'ARNP II, TFII-I and YY1 (Butler et Kadonaga, 2002).

Le DPE est situé en aval du site d'initiation de la transcription à environ une trentaine de paires de bases de celui-ci et a pour séquence consensus $\square (A/G_{+28})G(A/T)(C/T)(G/A/C)$. Il se retrouve essentiellement dans les promoteurs manquant de boîte TATA. TFIID, par l'intermédiaire de TAFII60 chez la drosophile, lie le DPE de façon coopérative avec l'Inr (Burke et Kadonaga, 1996).

Le BRE, comme son nom l'indique, est reconnu par le facteur de transcription TFIIB et a pour séquence consensus $\square (G/C)(G/C)(G/A)CGCC$. Il se situe immédiatement en amont de certaines boîtes TATA (Lagrange *et al.*, 1998). Cet élément pourrait avoir un effet positif ou négatif sur la transcription de base.

1.2 Les éléments de régulation

Bien que toutes les cellules d'un organisme possèdent la même information génétique, le taux d'expression d'un gène donné n'est pas forcément similaire dans chaque tissu différencié. Ainsi, les gènes possèdent dans leur promoteur des séquences régulatrices qui leur sont propres et qui permettent le contrôle de leur expression par des protéines régulatrices (figure 1). Ces séquences permettent d'adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins physiologiques et à l'état de différenciation de la cellule. Il existe deux types d'éléments de régulation, classés selon leur éloignement du site d'initiation de la transcription : les séquences proximales et les séquences distales.

a) Les séquences régulatrices proximales

Généralement situées entre 40 et 110 paires de bases en amont du site d'initiation et parfois présentes en plusieurs exemplaires, les séquences proximales peuvent avoir un effet activateur (UAS pour *upstream activating sequence*) ou répresseur (URS pour *upstream repressing sequence*) en fonction de l'activité de la protéine qui les reconnaît. Les deux séquences les mieux étudiées sont les boîtes CAAT et les motifs riches en GC. Ces séquences d'ADN sont en général reconnues par des protéines qui régulent la transcription par contacts directs avec la machinerie de transcription de base. C'est le cas de l'activateur transcriptionnel Sp1 qui se fixe sur les motifs riches en GC et y recrute à la fois la machinerie de transcription (Gill *et al.*, 1994) et la machinerie de remodelage de la chromatine (Doetzlhofer *et al.*, 1999).

b) Les séquences régulatrices distales

Les éléments distaux du promoteur peuvent être situés jusqu'à quelques milliers de paires de bases en amont ou en aval du site d'initiation (Ptashne, 1988). Ces éléments peuvent activer la transcription, on les appellera alors 'enhancers', ou la réprimer, on parlera de 'silencers'. Les séquences activatrices peuvent agir indépendamment de leur orientation en *cis* (c'est-à-dire en étant sur la même molécule d'ADN) ou en *trans*. Des études génétiques menées chez la drosophile ont en effet montré qu'un gène pouvait être activé par un enhancer situé sur le chromosome homologue (Goldsborough et Kornberg, 1996). Le mécanisme d'action par lequel des séquences éloignées régulent la transcription est encore assez mal connu. Une hypothèse séduisante propose qu'un repliement de l'ADN permettrait le rapprochement de ces séquences régulatrices du site d'initiation et, de ce fait, des interactions avec la machinerie de transcription, permettant ainsi de passer outre les séquences qui isolent les différents loci du génome appelés les insulateurs (Morris *et al.*, 1998).

2. Les facteurs généraux de la transcription

L'expression des gènes de classe II chez les eucaryotes est médiée par l'enzyme catalysant la réaction de transcription □ l'ARN polymérase II (ARNP II). Seule, cette enzyme n'est cependant pas capable d'initier spécifiquement la transcription sans la présence de facteurs de base qui *in vitro* permettent, avec l'ARNP II, l'initiation de la transcription sur un ADN contenant un promoteur minimal. Ces facteurs sont au nombre de six □ TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (tableau 1) (Orphanides *et al.*, 1996). *In vivo* des facteurs modulent cette activité transcriptionnelle de base, ce sont les activateurs et les répresseurs de la transcription. Je décrirai brièvement le rôle de ces facteurs, pour, dans une prochaine section, m'attarder sur l'ARNP II (voir section I.3).

Facteur	Sous-unités	Propriétés
TFIIA	□ (37 kDa)	- Dissocie les dimères de TBP - Requise pour l'activation de la transcription
	□ (19 kDa)	Requises pour l'activation et l'anti-répression de la transcription.
	□ (13 kDa)	
TFIIB	35 kDa	- Stabilise le complexe TFIID-ADN - Sélectionne le site d'initiation - Recrute le complexe TFIIF-ARNP II - Activité acétylase
TFIID	TBP (38 kDa)	Interagit avec la boîte TATA
	TAFII250	Activités histone acétyltransférase, histone ubiquitine-ligase et kinase
	TAFII150	Interagit avec l'élément DPE
	TAFII135	
	TAFII100	
	TAFII80/70	Structure de type histone
	TAFII55	
	TAFII31/32	Structure de type histone
	TAFII30	
	TAFII28	Structure de type histone
	TAFII20/15	Structure de type histone
TFIIE	□ (56 kDa)	Recrute et module les activités de TFIIF
	□ (34 kDa)	
TFIIF	RAP74 (74 kDa)	- Recrute l'ARNP II, - Facteur d'élongation
	RAP30 (30 kDa)	- Activité kinase
TFIIH	voir chapitre III	Activités hélicases, ATPases et kinase

Tableau 1: Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription.

2.1 TFIID

TFIID est un facteur multiprotéique comprenant la TBP, qui est la protéine reconnaissant spécifiquement la boîte TATA, et de multiples facteurs associés à la TBP les

TAF. Les TAF sont impliqués dans la sélection du promoteur mais pourraient aussi jouer le rôle de coactivateurs transcriptionnels (Burley et Roeder, 1996 ; Lee et Young, 2000). *In vitro* TBP est suffisant pour transcrire un gène dont le promoteur contient une boîte TATA. Les TAF, en interagissant avec les éléments Inr et DPE, eux sont nécessaires à la transcription de base des gènes ne contenant pas de boîte TATA. La composition en TAF de TFIID varie suivant le type de promoteur sur lequel il se fixe (Jacq *et al.*, 1994). Il faut noter que les TAF se retrouvent *in vivo* dans des complexes autres que TFIID, tel que le complexe contenant PCAF qui contient une activité d'acétylation des histones (HAT) (Ogryzko *et al.*, 1998). L'inactivation de certains TAF chez la levure, ne provoque qu'une inhibition partielle de l'expression des gènes de classe II, montrant que les TAF ne sont pas universellement requis pour la transcription, à l'inverse des facteurs généraux de la transcription (Walker *et al.*, 1997). De plus, les TAF semblent être exprimés de façon ubiquitaire dans les cellules. Certains TAF ont une structure homologue à celles des histones, ils peuvent également former une structure similaire à celle observée pour les nucléosomes.

La structure cristallographique de TBP se caractérise par une forme en selle à cheval (figure 3). Cette structure est conservée aussi bien chez la levure, *Arabidopsis thaliana* que chez l'homme.

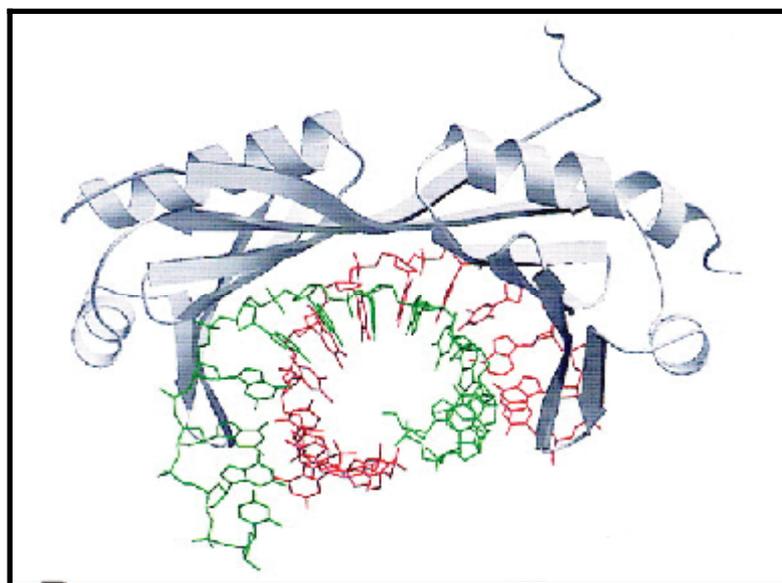


Figure 3 : Structure cristallographique de TBP sur l'ADN.
(D'après (Nikolov *et al.*, 1996)).

En se fixant sur le promoteur, TBP crée une courbure de l'ADN d'environ 90° qui permettrait le rapprochement des séquences situées en amont avec celles situées en aval de la TATA et empêcherait la compaction de l'ADN en chromatine. TBP existe dans la cellule sous

forme de dimères, responsables de la dimérisation de TFIID. La fixation de TBP ou TFIID sur le promoteur nécessite une dissociation de ces dimères (Coleman et Pugh, 1997). La TBP est le seul facteur de base à être impliqué dans la transcription des trois classes de gènes (ARN ribosomiques, messagers et de transfert). En effet, TBP s'associe à trois classes de TAF différents pour former les complexes SL1, TFIID ou TFIIB participant respectivement à la transcription des gènes de classe I, II ou III.

Enfin, il est important de noter que des facteurs homologues à TBP (TRF) ont été identifiés chez différents eucaryotes comme la drosophile et l'homme (Rabenstein *et al.*, 1999) ces facteurs se retrouvent dans des complexes associés à des nTAF (pour *nTRF associated factors*). De plus, un autre complexe (TFTC pour *TBP-free TAF containing complex*) ne contenant pas de TBP mais plusieurs TAF, a été isolé chez l'homme. Ce complexe est capable d'initier la transcription *in vitro* sur un promoteur avec ou sans boîte TATA (Wieczorek *et al.*, 1998). Ces dernières observations montrent comment la cellule s'est adaptée pour réguler son expression génique au cours du développement et de la différenciation.

2.2 TFIIB

TFIIB est une protéine de 35 kDa, son domaine carboxy-terminal contient deux répétitions de cinq hélices formant une structure globulaire alors que son domaine amino-terminal contient un 'zinc ribbon' et un doigt de zinc. Ces deux domaines seraient responsables de la reconnaissance ADN/TFIID. TFIIB reconnaît la structure formée par l'association ADN/TFIID et ne peut se fixer au niveau du promoteur que si TBP est présente. TFIIB interagit aussi bien avec le domaine carboxy-terminal de TBP qu'avec des séquences d'ADN situées en aval et en amont de la boîte TATA, en se plaçant dans la zone concave formée par la courbure de l'ADN (Orphanides *et al.*, 1996). La majeure partie de TFIIB se trouve en aval de la boîte TATA. Cette asymétrie pourrait être responsable de l'orientation de la transcription du côté du site d'initiation (Tsai et Sigler, 2000). De plus, chez la levure, des mutations dans le gène *TFIIB* entraînent un déplacement du site d'initiation de la transcription (Pinto *et al.*, 1994). Ce facteur est responsable du recrutement de la polymérase ainsi que de TFIIF par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal qui interagit avec ces deux facteurs (Ha *et al.*, 1993). Il jouerait le rôle de lien entre l'ARNP II et les facteurs généraux de la transcription.

De plus, TFIIB inhibe la déphosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARNP II par la phosphatase FCP1 (Kobor *et al.*, 2000). Enfin, une étude récente vient de

révéler une activité d'autoacétylation au sein de TFIIB, cette activité stabiliserait l'interaction TFIIF/TFIIB et activerait la transcription (Choi *et al.*, 2003).

2.3 TFIIF

TFIIF est un hétérotétramère (2x2) composé de deux sous-unités de 30 et 74 kDa. TFIIF, comme le facteur bactérien sigma, lie l'ARNP II et stabilise le complexe de pré-initiation. Il serait responsable du positionnement correct de l'ARNP II en réduisant les interactions non-spécifiques de celle-ci avec l'ADN. TFIIF favorise l'enroulement de l'ADN, sur près d'un tour, autour de l'ARNP II et interagit avec l'ADN, entre la boîte TATA et le site d'initiation (Robert *et al.*, 1998). Il interagit également avec de nombreux partenaires dont TFIIB, TFIIE, TBP, TAFII250 ainsi qu'avec TAFII100. Cette dernière interaction semble indispensable à l'initiation de la transcription. Outre son rôle dans l'initiation de la transcription, TFIIF est impliqué dans la transition initiation-élongation, en inhibant un arrêt prématuré de la polymérase, ainsi que dans l'élongation de la transcription où il stabiliserait la polymérase et stimulerait cette étape (Lei *et al.*, 1999). L'activité de TFIIF peut être régulée par de nombreuses modifications. En effet, ce facteur peut être acétylé, ADP-ribosylé, phosphorylé par la kinase associée à TFIIH (Yankulov et Bentley, 1997) ou par TAFII250, et peut également s'autophosphoryler (Rossignol *et al.*, 1999 ;). La résolution récente de la structure d'un complexe ARNP II/TFIIF par microscopie électronique a permis de confirmer la forte homologie existante entre le facteur bactérien sigma et TFIIF. De plus, TFIIF semble être distribuée, comme le facteur sigma, tout autour de la surface de l'ARNP II (Chung *et al.*, 2003).

2.4 TFIIE

TFIIE est un hétérotétramère, composé de deux sous-unités de 34 et 56 kDa, il pourrait être recruté par la sous-unité Rpb9 de l'ARNP II lors de l'initiation de la transcription (Van Mullem *et al.*, 2002). De plus, TFIIE recrute le complexe TFIIH dans le complexe de pré-initiation, via deux de ses sous-unités, avec lesquelles TFIIE interagit (XPB et p62). La petite sous-unité de TFIIE, présente légèrement en amont du site d'initiation de la transcription, possède un motif en doigt de zinc indispensable à l'association de TFIIE avec l'ADN. Elle est supposée jouer un rôle dans l'ouverture de la double hélice d'ADN, en partenariat avec TFIIH. En effet, TFIIE stimule l'activité kinase et ATPase de TFIIH (Ohkuma et Roeder, 1994). Il est

à noter que la transcription à partir d'une matrice super-enroulée ne nécessite ni TFIIE ni TFIIH, sa fonction est donc intimement liée à celle de TFIIH (Timmers, 1994).

2.5 TFIIA

TFIIA est constitué de trois sous-unités de 13, 19 et 37 kDa. La nécessité de TFIIA est fortement dépendante du système de transcription *in vitro* utilisé. En effet, dans un système utilisant une TBP recombinante, TFIIA n'est pas requis, alors que si TFIID est substitué à TBP TFIIA devient nécessaire à la transcription. *In vitro* les réactions de transcription requièrent généralement TFIIA pour répondre aux activateurs. Une fonction importante de TFIIA serait d'empêcher l'effet de certains répresseurs qui inhibent la transcription □ effet anti-répresseur. Par exemple TFIIA peut déplacer de TBP la topoisomérase I qui a un effet négatif sur la transcription (Merino *et al.*, 1993). Néanmoins le rôle prépondérant de TFIIA est reflété par le fait que les gènes codants pour ce facteur sont vitaux chez la levure. Lors de l'initiation de la transcription TFIIA lie le complexe TBP/ADN et augmente l'affinité de la TBP pour la boîte TATA (Imbalzano *et al.*, 1994).

3. L'ARN polymérase II eucaryote

L'ARNP II est très conservée chez les eucaryotes et la plupart des études sur l'ARNP II ont été conduites chez la levure, c'est pourquoi je parlerai d'ARNP II eucaryote tout en précisant quand il s'agit de l'enzyme humaine. L'ARNP II est un complexe multiprotéique de 12 sous-unités, nommées Rpb1 à Rpb12 (tableau 2). Elle fut initialement purifiée en utilisant un système de transcription *in vitro* avec un ADN sans promoteur (Lee et Young, 2000). Cette enzyme possède à elle seule l'activité de synthèse de l'ARN *in vitro*, mais ne peut reconnaître un promoteur sans les facteurs généraux de la transcription. Les 12 gènes de l'ARNP II ont été clonés et montrent une remarquable conservation fonctionnelle et structurale entre la levure et l'homme. En effet, la plupart des gènes humains peuvent se substituer à leur homologue de levure. De nombreuses interactions entre les différentes sous-unités Rpb humaines (hRpb) ont été détaillées, montrant l'importance de la paire Rpb3/Rpb5 dans l'organisation du complexe enzymatique (Acker *et al.*, 1997). L'ARNP II eucaryote partage de nombreuses caractéristiques avec son homologue bactérien. Le complexe bactérien est composé du facteur σ , de 3 composants 'cœur' structurés en un tétramère $\sigma\sigma\sigma\sigma_2$ et d'un quatrième facteur σ_4 . Les sous-

unités Rpb1 et Rpb2 sont homologues aux protéines σ' et σ respectivement. Rpb3, Rpb11 et Rpb6 montrent aussi une faible homologie avec les sous-unités σ et σ' respectivement. Ces sous-unités (Rpb1, 2, 3, 6 et 11), orthologues de l'enzyme bactérienne, sont largement responsables de l'activité catalytique de l'ARNP II. Comme le montre le tableau 2, cinq sous-unités sont communes aux trois ARNP eucaryotes. De plus, chaque sous-unités confèrent diverses fonctions à l'ARNP II.

	Sous-unités	Propriétés
ARNP II	Rpb1 (192 kDa)	Contient le CTD, lie l'ADN, impliqué dans la sélection du site d'initiation de la transcription, orthologue de σ'
	Rpb2 (139 kDa)	Contient le site actif, impliqué dans la sélection du site d'initiation de la transcription, orthologue de σ
	Rpb3 (35 kDa)	Serait l'orthologue, avec Rpb11, du dimère σ_2 de la polymérase procaryote
	Rpb4 (25 kDa)	Forme un sous complexe avec Rpb7
	Rpb5 (25 kDa)	Sous-unité commune des ARNP I et III, cible d'activateurs transcriptionnels
	Rpb6 (18 kDa)	Sous-unité commune des ARNP I et III, orthologue de σ
	Rpb7 (19 kDa)	Forme un sous complexe avec Rpb4
	Rpb8 (17 kDa)	Sous-unité commune des ARNP I et III
	Rpb9 (14 kDa)	Impliqué dans la sélection du site d'initiation de la transcription
	Rpb10 (8 kDa)	Sous-unité commune des ARNP I et III
	Rpb11 (14 kDa)	Serait l'orthologue, avec Rpb3, du dimère σ_2 de la polymérase procaryote
	Rpb12 (8 kDa)	Sous-unité commune des ARNP I et III

Tableau 2: Composition et propriétés de l'ARNP II de levure.

3.1 Structure de l'ARNP II

Une énorme avancée dans la compréhension de cette grosse machine à transcrire a été réalisée récemment par le groupe du Dr. Kornberg qui a résolu la structure cristallographique de

l'ARNP II de levure libre ou en phase d'élongation (Cramer *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2001 ; Gnatt *et al.*, 2001) (figure 4).



Figure 4: Structure cristallographique de l'ARNP II de levure. (D'après (Cramer *et al.*, 2000)).

Cette structure montre comment les 10 sous-unités (- Rpb4 et 7) de l'ARNP II s'organisent autour du brin d'ADN. La comparaison de cette structure avec l'enzyme bactérienne a révélé d'étonnantes similitudes au sein du cœur de l'enzyme ; elle a aussi pu confirmer les homologues entre les sous-unités bactériennes (σ₃₂) et eucaryotes (Rpb1, 2, 3, 6 et 11) (Cramer, 2002). De plus, cette structure a permis de montrer pour la première fois et de façon non-équivoque que : 1) l'hybride ADN/ARN s'étend sur 9 paires de bases, 2) l'ADN est ouvert au plus de 4 paires de bases en aval de l'extrémité 3' de l'ARN et 3) l'ARN non hybridé à l'ADN sort près du CTD de l'ARNP II.

Cette structure a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'ARNP II. En effet, les sous-unités Rpb1 et 2 sont situées au centre du complexe d'élongation formant une cripte autour de l'ADN pour mieux le lier ; les autres plus petites sous-unités sont arrangées autour de la surface de l'enzyme. La structure de l'ARNP II libre montre une région en forme de pince d'environ 50 kDa composée des sous-unités Rpb1, 2 et 3. Cette pince, ouverte dans la forme libre de l'enzyme, se referme fermement autour de l'hybride ADN/ARN dans l'ARNP II lors de l'élongation. Une hélice dite de 'pontage' (pour *bridging helix*) traverse la cripte formée

par Rpb1 et 2. Des acides aminés de cette hélice se retrouvent en contact direct avec la base codante du brin transcrit de l'ADN. Un changement de conformation de cette hélice lors de l'élongation pourrait promouvoir la translocation de l'ARNP II. Un inhibiteur spécifique de la synthèse de l'ARN lie les acides aminés, en contact avec la base codante de l'ADN, de cette hélice (Bushnell *et al.*, 2002). De plus, les sous-unités Rpb1, 2, 6 et 9 forment deux mâchoires parfaitement positionnées pour guider l'ADN dans le site catalytique. Enfin, la sortie de l'ARN près du CTD de Rpb1 permettrait le couplage transcription-maturation, sachant que différents facteurs de maturation interagissent avec le CTD (**publication 1**).

Il faut noter que la structure de l'ARNP II a été déterminée sans les sous-unités Rpb4 et Rpb7. Ces 2 sous-unités forment un sous complexe qui peut se retrouver attaché à l'ARNP II de levure suivant l'état physiologique de la cellule (Choder et Young, 1993).

3.2 Le CTD : structure et fonction (**publication 1**)

Cette revue détaille le rôle du domaine carboxy-terminal de la plus grande sous-unité de l'ARNP II Rpb1. Ce domaine a en effet une structure particulière il comporte, chez l'homme, 52 répétitions du même motif (Tyr₁Ser₂Pro₃Thr₄Ser₅Pro₆Ser₇). Il est conservé de la levure à l'homme. Le CTD se retrouve hautement phosphorylé (sur la Tyr₁ et les Ser₂-Ser₅) et déphosphorylé lors des différentes étapes de la transcription. Ces phospho/déphosphorylations permettent le recrutement de différents facteurs tout au long de la transcription. Des protéines kinases et phosphatases régulent ces changements conformationnels du CTD. De plus, ce domaine joue un rôle crucial dans les mécanismes de maturation de l'ARN_{pré-m}. De nombreuses interactions ont été établies entre le CTD et des facteurs de maturation de l'ARN_{pré-m}, expliquant ainsi le couplage maturation-transcription de celui-ci.

PUBLICATION 1

[signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Patrick S. Lin, **Alexandre Tremeau-Bravard**, Michael E. Dahmus

The repetitive C-terminal domain of RNA polymerase II : multiple conformational states drive the transcription cycle.

The chemical record 3 (2003), 235-245

Pages 235-245 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/106560725/PDFSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

4. Les étapes de la transcription

La transcription peut être divisée en trois grandes étapes : l'initiation (synthèse des premiers ribonucléotides), l'élongation (allongement de la chaîne d'ARN) et la terminaison (détachement de l'ARN et départ de la machinerie de transcription de l'ADN). L'initiation de la transcription peut de nouveau être divisée en quatre parties : l'assemblage du complexe de pré-initiation (PIC), l'ouverture de la double hélice d'ADN, la synthèse des premiers ribonucléotides et la libération de l'ARNP II de son ancrage au promoteur (échappée du promoteur).

4.1 L'initiation

a) Formation du PIC et holoenzyme

L'initiation de la transcription débute par l'assemblage du PIC sur le promoteur du gène à transcrire. Deux voies sont possibles pour former ce PIC : la voie de l'assemblage séquentiel où les facteurs se fixent dans un ordre établi et la voie de l'holoenzyme où tous les facteurs, à l'exception de TFIID, sont pré-assemblés au sein d'un gros complexe protéique et viennent se fixer ensemble au promoteur. La fixation en premier lieu de TFIID sur le promoteur constitue le seul point commun entre ces deux modèles d'assemblage (figure 5).

La fixation de TFIID sur le promoteur provoque une distorsion de l'ADN. Cette structure TFIID/ADN est reconnue par TFIIB et lui permet de venir interagir correctement avec le promoteur (Nikolov et Burley, 1997). La structure TFIID/TFIIB/ADN est ensuite reconnue par le complexe ARNP II/TFIIF. L'ARNP II et TFIIF sont en effet capables de s'associer l'un à l'autre et de rejoindre ainsi le PIC en formation. TFIIF stabilise l'ARNP II sur le complexe TFIID/TFIIB/ADN. La liaison directe de TFIIE avec la polymérase, la grande sous-unité de TFIIF et TFIID, constitue l'étape suivante de la formation du PIC (Orphanides *et al.*, 1996 ; Zawel et Reinberg, 1995). En interagissant avec TFIIH, TFIIE permet ensuite le recrutement de ce complexe sur le promoteur (Maxon *et al.*, 1994). Cette dernière étape permet la complétion de la formation du PIC.

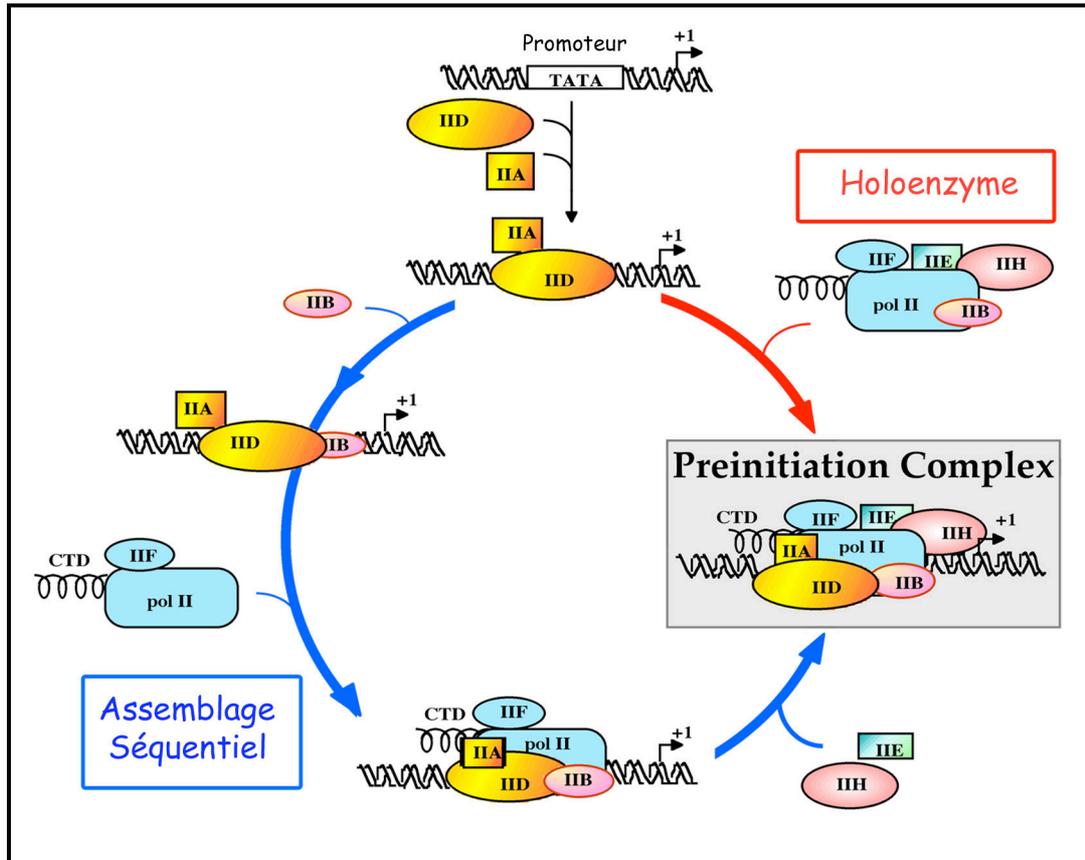


Figure 5: Formation du complexe de pré-initiation.

Ce modèle de formation du PIC, qui suppose un assemblage séquentiel des différents composants de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur, est basé sur des observations faites lors de la reconstitution de la réaction de transcription *in vitro* permettant l'ajout successif de chacun de ces facteurs. Si ces expériences ont permis de comprendre la fonction précise de chaque facteur de transcription dans cette réaction basale, il semble cependant qu'un autre modèle puisse être envisagé. En effet, de nombreux laboratoires ont mis en évidence l'existence de très gros complexes, appelés holoenzyme, au sein desquels tous les facteurs de transcription et l'ARNP II sont pré-assemblés et y sont associés à des co-régulateurs de la transcription (Chao *et al.*, 1996 ; Koleske et Young, 1994 ; Lemon et Tjian, 2000 ; Maldonado *et al.*, 1996).

Chez la levure, des approches génétiques visant à identifier des gènes supprimant le phénotype thermosensible provoqué par la délétion d'une partie du CTD de l'ARNP II, ont conduit à la caractérisation d'un complexe comprenant les protéines SRB, l'ARNP II et les GTF TFIIB, TFIIF et TFIIH (Koleske et Young, 1994). Cette holoenzyme peut être séparée en ARNP II, GTF et un complexe associé au CTD en incubant les préparations d'holoenzyme avec un

anticorps dirigé contre le CTD. Ce sous complexe, dissocié du CTD, est suffisant pour répondre aux activateurs de la transcription quand il est incubé avec l'ARNP II et les GTF dans des expériences de transcription *in vitro* il fut donc nommé médiateur de l'activation (Hengartner *et al.*, 1995 ; Kim *et al.*, 1994). Ce complexe médiateur, comme son nom l'indique, joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription en relayant les signaux transmis par les activateurs à l'ARNP II et aux différents GTF. Il est composé d'au moins une vingtaine de protéines et peut être classé en différents sous-complexes que l'on retrouve conservés chez l'homme (Lee et Young, 2000).

Chez les mammifères des expériences d'immunoprécipitation utilisant des anticorps dirigés contre des protéines homologues aux SRB de levure ont permis de purifier des complexes holoenzyme similaires à ceux de levure (Chao *et al.*, 1996). Différentes holoenzymes ont été purifiées suivant des méthodes similaires et montrent une conservation entre le complexe SRB/médiateur de levure et celui de l'homme. De plus, le gène *SRB7* de souris est exprimé de façon ubiquitaire et est essentiel à la viabilité de l'animal (Tudor *et al.*, 1999). Malgré ces évidences favorisant le modèle de l'holoenzyme dans le mécanisme de transcription *in vivo*, certaines études comme celle de Kimura *et al.*, mettent en doute un tel modèle (Kimura *et al.*, 1999). En effet, seulement 3% des molécules d'ARNP II d'une fraction soluble de cellules HeLa se retrouvent engagées dans l'holoenzyme. Néanmoins, des études cytologiques montrent que les foyers de transcription sont essentiellement regroupés dans des unités de transcription au sein du noyau de la cellule (Iborra *et al.*, 1996) ; les complexes holoenzyme pourraient se retrouver dans de telles structures. En effet, les ARNP I se retrouvent groupées au sein d'une structure nommée nucléole où se déroule la synthèse des ARNr.

b) Ouverture de l'ADN et échappée du promoteur

Lorsque la machinerie de transcription a été assemblée sur le promoteur, l'initiation de la transcription débute, en présence de nucléotides triphosphates, par l'ouverture de l'ADN autour du site d'initiation, entre les positions -9/+2 (Holstege *et al.*, 1997) (figure 6). Cette ouverture conduit à la formation du complexe ouvert de pré-initiation (POC pour *pre-initiation open complex*). La durée de vie de ce complexe est courte (40 sec) et nécessite l'activité hélicase de TFIIH (Holstege *et al.*, 1997). La séparation des deux brins de la double hélice est catalysée par la sous-unité hélicase XPB de TFIIH (Guzder *et al.*, 1994 ; Holstege *et al.*, 1996) (**publication 2**), de façon dépendante de l'ATP (Yan et Gralla, 1997). De plus, XPB semble être nécessaire à

l'ouverture de l'ADN *in vivo* (Guzman et Lis, 1999). Il faut noter que l'hydrolyse de la liaison γ - δ de l'ATP n'est pas nécessaire à cette étape de l'initiation (Timmers, 1994). La torsion induite par la fixation de TBP pourrait générer une ouverture locale de l'ADN, qui servirait de point de démarrage à l'hélicase XPB. L'initiation de la synthèse d'ARN aboutit à la formation d'un dinucléotide, qui stabilise le complexe ouvert mais n'empêche pas de nombreuses synthèses avortées reflétant une faible association du transcrit au complexe de transcription. Jusqu'à la formation d'un transcrit d'au moins 4 nucléotides, la région ouverte est fortement instable et peut facilement réadopter la conformation double brin (Holstege *et al.*, 1997). L'élongation de la bulle de transcription, sans déplacement de celle-ci, mène à la formation du complexe ouvert d'initiation (IOC pour *initiation open complex*) induit par la synthèse des premières liaisons phosphodiester au sein de la chaîne d'ARN naissante. La région d'ADN ouverte se propage alors jusqu'à la position +9. Cette propagation pourrait se faire de manière continue ou en plusieurs étapes (Holstege et Timmers, 1997 ; Yan et Gralla, 1997).

Lorsque la chaîne d'ARN comprend 10 ribonucléotides (position +11), l'ADN en amont de la machinerie de transcription se referme de la position -9 jusqu'à la position +3 (ouverture +3/+11). Ce changement conformationnel est considéré comme l'échappée du promoteur puisque les complexes atteignant la position +11 sont incapables de ré-initier la transcription (Holstege *et al.*, 1997). Il dépend de l'activité hélicase de la sous-unité XPB de TFIIH, de la présence physique de la sous-unité XPD et du domaine carboxy-terminal de p44 (Bradsher *et al.*, 2000 ; Moreland *et al.*, 1999) (**publication 3**). XPB pourrait, en particulier, rompre l'interaction de TFIIIF avec les séquences promotrices en aval du +1 interaction qui maintiendrait l'enroulement de l'ADN autour de la polymérase (Robert *et al.*, 1998). En effet, les séquences d'ADN en aval du +1 sont nécessaires à l'activité d'ouverture du promoteur et de son échappée par XPB (Dvir *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2000b ; Spangler *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'échappée du promoteur nécessite la rupture des interactions entre l'ARNP II et les facteurs d'initiation. Ces événements pourraient être favorisés par la phosphorylation du CTD de l'ARNP II par TFIIH (Feaver *et al.*, 1994 ; Hengartner *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 1992). En effet, TBP et TFIIIE interagissent préférentiellement avec la forme hypophosphorylée du CTD (forme appelée IIA), suggérant que lorsque ce dernier se retrouve hyperphosphorylé (forme appelée IIO), TBP et TFIIIE se désolidarisent de la polymérase (Maxon *et al.*, 1994 ; Usheva *et al.*, 1992). De plus, en phase d'élongation, le CTD est hyperphosphorylé. C'est cette forme de l'ARNP II qui est reconnue par des facteurs d'élongation de la transcription (Otero *et al.*, 1999). Le CTD est donc un des éléments de régulation de la transcription par

phosphorylation-déphosphorylation (Riedl et Egly, 2000) (**publication 1**). Bien que certaines données aient montré que l'inactivation de *cdk7* n'empêche pas l'initiation de la transcription et l'échappée du promoteur *in vitro* (Bradsher *et al.*, 2000), la phosphorylation du CTD par cette kinase de TFIIH favorise la transcription *in vivo* chez la levure et la drosophile (Akoulitchev *et al.*, 1995 ; Leclerc *et al.*, 2000). L'importance de la phosphorylation du CTD pourrait varier en fonction du promoteur considéré. En effet, la phosphorylation du CTD de l'ARNP II n'est pas nécessaire dans des expériences de transcription *in vitro* utilisant le promoteur tardif majeur de l'adénovirus (AdMLP) comme matrice, mais elle devient indispensable sur une matrice contenant le promoteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) (Kang et Dahmus, 1993 ; Kim et Dahmus, 1989).

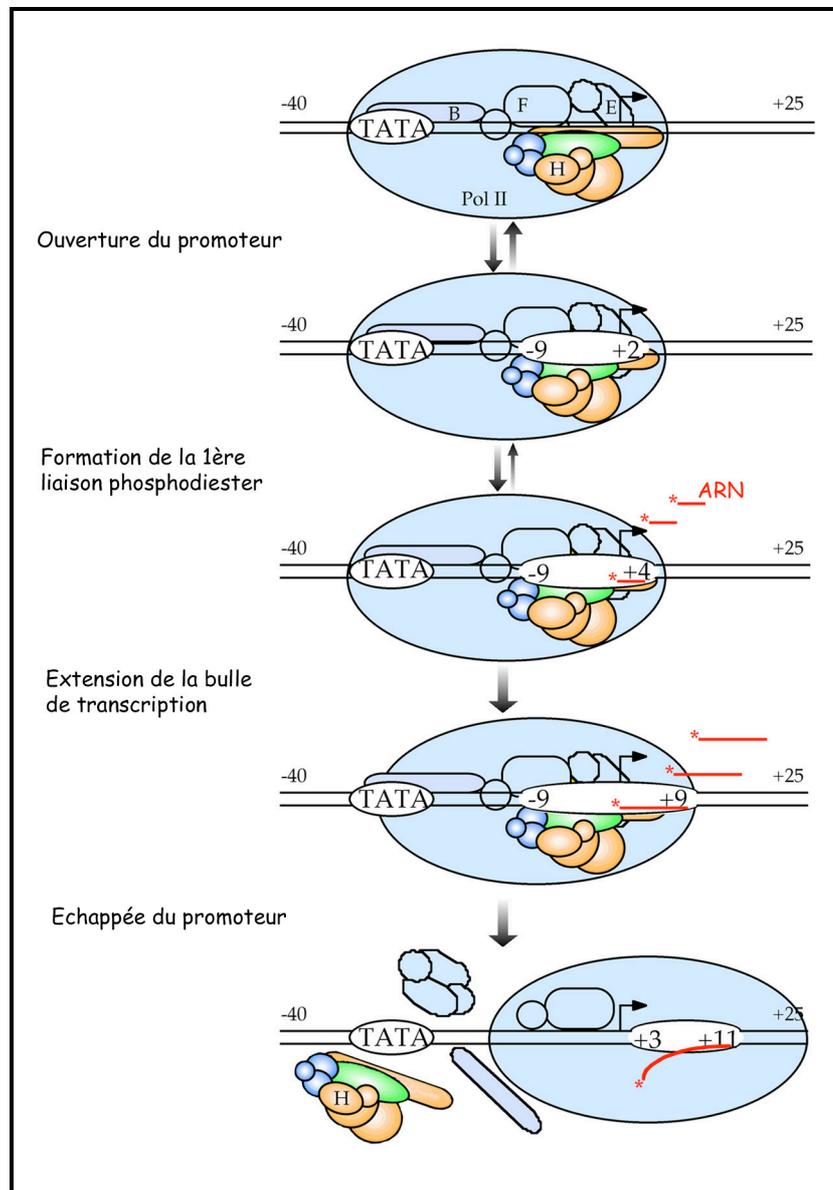


Figure 6: Les différentes étapes de l'initiation de la transcription.

La réaction d'initiation s'achève par le départ des facteurs d'initiation de la bulle de transcription. Alors que TFIIB et TFIIE se dissocient de la polymérase lorsque la chaîne d'ARN atteint une quinzaine de nucléotides, TFIID reste fixé sur le promoteur. TFIIH et TFIIF sont associés à la polymérase jusqu'à la position +30. TFIIF peut se ré-associer à cette polymérase en mode d'élongation (Zawel *et al.*, 1995). Ce facteur semble, outre son rôle lors de l'élongation, jouer un rôle prépondérant dans l'étape d'échappée du promoteur (Yan *et al.*, 1999).

4.2 L'élongation

Lorsque le transcrit atteint 11-15 ribonucléotides et que la région en amont du site d'initiation est refermée, la bulle de transcription progresse au fur et à mesure de la synthèse de l'ARN. L'ADN est alors ouvert sur douze à quinze paires de bases et huit ou neuf ribonucléotides sont hybridés au brin codant de l'ADN formant une structure ADN/ARN qui correspond à la bulle d'élongation (Gnatt *et al.*, 2001 ; Sidorenkov *et al.*, 1998).

Les ARN sont synthétisés *in vivo* à une vitesse d'environ 1500-2000 nucléotides par minute alors que la vitesse de polymérisation de l'ARNP II purifiée *in vitro* n'est que de 100-300 nucléotides par minute (Izban et Luse, 1992). L'augmentation de la vitesse catalytique, l'atténuation des sites de pause ou la reprise de la transcription après arrêt de la polymérase nécessitent l'action de facteurs d'élongation (Shilatifard *et al.*, 2003). Le mode d'action de ces protéines n'est pas encore clairement établi. On sait pourtant qu'elles régulent positivement ou négativement l'élongation selon trois mécanismes.

In vivo, l'ARNP II oscille entre une conformation active ou inactive à chaque ajout de nucléotides, marquant ainsi une pause dans l'élongation du transcrit (Uptain *et al.*, 1997). Le taux d'élongation de l'ARNP II est donc dicté, non seulement par le taux de formation de la liaison phosphodiester, mais aussi par la fraction de temps durant laquelle l'ARNP II se retrouve en conformation inactive, en pause. Une première classe de facteurs d'élongation, qui inclut TFIIF, les élongines et les protéines de la famille ELL (pour *eleven-nineteen lysine-rich leukemia*), interagit directement avec l'ARNP II et augmente sa vitesse catalytique en supprimant les arrêts transitoires de l'enzyme à chaque étape d'ajout de ribonucléotides (Shilatifard *et al.*, 2003). Le mécanisme d'action exact de ces facteurs n'est pas connu mais différentes données suggèrent qu'ils maintiennent l'extrémité 3'-OH du transcrit dans le site catalytique de l'ARNP II, prévenant ainsi le recul de l'enzyme et la pause dans l'élongation du transcrit. En effet, TFIIF et les élongines empêchent les pauses de l'ARNP II lors de l'élongation en interagissant

avec celle-ci ces pauses se produisant lorsque l'extrémité 3'-OH du transcrite se retrouve en dehors du site catalytique de l'enzyme (Gu et Reines, 1995). De plus, TFIIF, ELL et les élongines inhibent l'induction du clivage de l'ARN naissant par TFIIS (Elmendorf *et al.*, 2001).

Il faut savoir différencier une pause et un arrêt de l'ARNP II (figure 7). Ces deux mécanismes résultent du recul de l'ARNP II lors de l'élongation de la transcription. Un recul de 2-4 nucléotides correspond à une pause et l'ARNP II peut spontanément repartir en réalignant son site catalytique avec l'extrémité 3'-OH du transcrite. Lorsque le recul est trop prononcé (7-14 nucléotides), la polymérase ne peut plus ré-initier l'élongation (Komissarova et Kashlev, 1997). Le facteur TFIIS, en interagissant avec l'ARNP II, stimule l'activité endonucléase de la polymérase qui coupe l'ARN naissant et permet donc de recalibrer l'extrémité 3'-OH de l'ARN avec le site catalytique de l'enzyme. Le transcrite peut par la suite être allongé à partir de cette nouvelle extrémité (Rudd *et al.*, 1994).

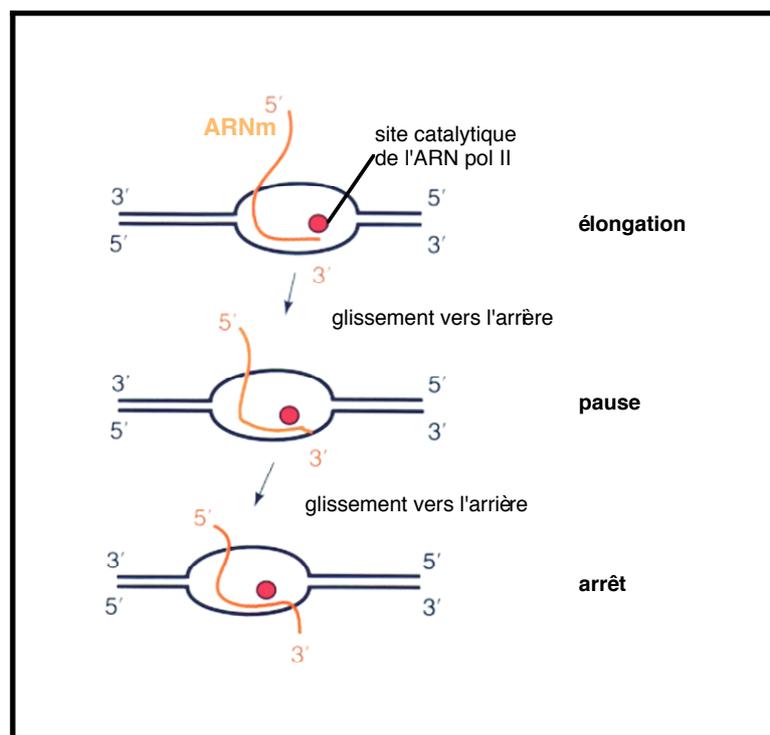


Figure 7 : Mécanisme de pause et d'arrêt de l'ARNP II lors de l'élongation.

Un autre mécanisme d'élongation, autre que celui d'empêcher l'arrêt de l'ARNP II, met en œuvre la phosphorylation-déphosphorylation du CTD de la polymérase (**publication 1**). En effet, les facteurs d'élongation P-TEFb (pour *positive transcription factor*), NELF (pour *negative elongation factor*) et DSIF (pour *DRB sensitivity inducing factor*) modulent l'état de phosphorylation du CTD de l'ARNP II, ce qui influence sa capacité à allonger le transcrite

(Marshall et Price, 1995 ; Wada *et al.*, 1998 ; Yamaguchi *et al.*, 1999). Comme décrit dans le paragraphe précédent, l'ARNP II se joint au complexe d'initiation sous une forme hypophosphorylée alors qu'elle est retrouvée sous forme hyperphosphorylée pendant l'étape d'élongation. P-TEFb, composé de la kinase cdk9 s'associant à différentes cyclines, phosphoryle la serine 2 de l'heptapeptide du CTD, activant ainsi l'élongation de la transcription (Marshall *et al.*, 1996). Il s'oppose à l'action de NELF et DSIF qui fonctionnent en synergie en arrêtant l'élongation par association à la polymérase et au transcrit (Yamaguchi *et al.*, 2002). La phosphorylation du CTD par P-TEFb pourrait en effet favoriser la dissociation de DSIF de l'ARNP II. De plus, P-TEFb est également capable de phosphoryler directement DSIF, régulant ainsi son activité (Kim et Sharp, 2001).

A l'inverse des facteurs qui viennent d'être évoqués, les protéines Elongator et FACT (pour *facilitates chromatin transcription*) n'affectent pas directement l'activité de l'ARNP II. Ils stimulent l'élongation en modifiant les nucléosomes de façon à favoriser le passage de la polymérase à travers la chromatine. En effet, le facteur Elongator se retrouve associé à la forme hyperphosphorylée de l'ARNP II et active l'élongation de la transcription *in vivo* (Otero *et al.*, 1999). Une de ses sous-unités comprend une activité HAT. FACT est nécessaire à la transcription de l'ARNP II *in vitro* sur une matrice contenant des histones. Il aide la polymérase à passer à travers ceux-ci en les déplaçant et il possède une activité de chaperon des histones (Belotserkovskaya *et al.*, 2003). Enfin, FACT peut fonctionner avec P-TEFb pour empêcher l'arrêt de la polymérase induit par les facteurs DSIF/NELF (Wada *et al.*, 2000).

4.3 La terminaison

L'étape finale de la transcription permet d'une part le relargage du transcrit du site actif de l'enzyme, et d'autre part la dissociation de l'ARNP II de la matrice d'ADN. Cela facilite le recyclage de la polymérase qui est alors prête à participer à la formation d'un nouveau complexe de pré-initiation pour entamer un autre cycle de transcription (**publication 1**).

Très peu de données sont disponibles sur les mécanismes mis en jeu. La terminaison de la transcription dépend de la présence du signal de polyadénylation (Birse *et al.*, 1998). D'autres résultats montrent d'ailleurs que l'efficacité de terminaison est directement corrélée à la force de ce signal (Osheim *et al.*, 1999). Le facteur de maturation de l'ARNm CPSF (pour *cleavage and polyadenylation specificity factor*), qui voyage avec le CTD de la polymérase depuis l'initiation de la transcription, reconnaît le signal poly(A) (Dantonel *et al.*, 1997). L'élongation ainsi que la

terminaison de la transcription semblent donc être intimement liées à la maturation de l'ARN. En effet, de nombreux facteurs d'épissage peuvent interagir avec le CTD hyperphosphorylé de l'ARNP II (Proudfoot *et al.*, 2002). Lors de la terminaison, l'ARN polymérase pourrait subir des changements de conformation qui diminueraient sa processivité et induiraient une pause dans la progression de la transcription en aval du signal poly(A). Par exemple, la phosphatase FCP1, spécifique du CTD de l'ARNP II, pourrait permettre le recyclage de la polymérase à la fin du cycle de transcription (**publication 1**). Cet arrêt transitoire de la polymérase permettrait la coupure, la polyadénylation, le relargage du transcrit et le détachement de la polymérase par un mécanisme inconnu.

La coupure du transcrit et le relargage de l'ARNP II semblent également être influencés par l'existence de sites de pause de la polymérase en aval du signal de polyadénylation (Dye et Proudfoot, 2001).

5. La transcription dans un contexte chromatinien

5.1 Structure de la chromatine

Chez les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines au sein d'une structure appelée chromatine. Les principales protéines de la chromatine sont les histones, des protéines très conservées au cours de l'évolution et chargées positivement (basiques) qui s'associent très étroitement avec l'ADN (chargé négativement). En microscopie électronique, la chromatine donne l'image d'un chapelet de perles où des segments d'ADN nu séparent des repliements globulaires composés d'ADN et d'histones : les nucléosomes (figure 8). Chaque nucléosome, d'un diamètre de 10 nm, est constitué de deux hétérodimères d'histones H2A-H2B et d'un tétramère d'histones H3-H4 autour desquels l'ADN s'enroule en faisant 1,65 tour sur une longueur totale de 146 paires de bases (Arents *et al.*, 1991).

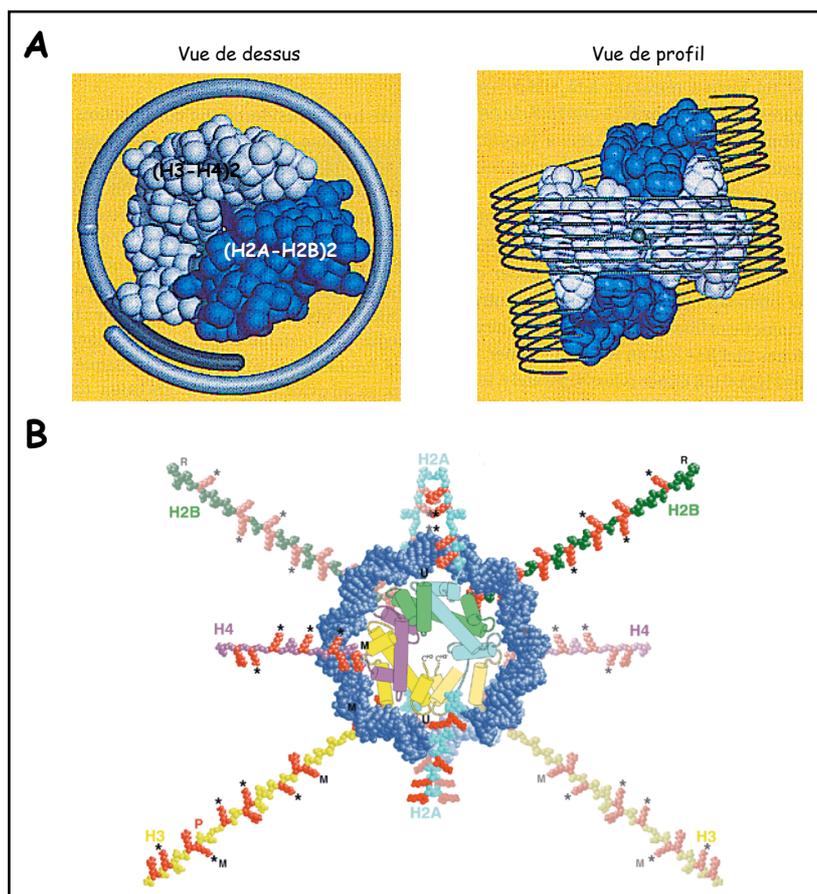


Figure 8 □: Le nucléosome.

Si les régions des histones qui forment le cœur globulaire de l'octamère, sont responsables des interactions entre histones et ADN, les régions amino-terminales de ces histones, riches en lysine, pointent vers l'extérieur des nucléosomes et sont la cible de nombreuses modifications covalentes. Cet assemblage nucléoprotéique est verrouillé par les histones H1 et H5 (*linker histones*) qui interagissent avec l'ADN. Deux nucléosomes sont séparés par environ 20 à 90 paires de bases. Le chapelet de nucléosomes est enroulé sur lui-même selon une hélice régulière (solénoïde) comprenant 6 nucléosomes par tour (Zlatanova *et al.*, 1998) (figure 9).

La structure en solénoïde d'un diamètre de 30 nm est ancrée de façon transitoire sur la matrice nucléaire, formant ainsi des boucles d'ADN ayant une taille de 60 kb. Enfin, des protéines non-histones du groupe HMG (pour *high-mobility group*) ou SIR (pour *silent information regulator*) participent à un empaquetage encore plus complexe de l'ADN, allant de l'euchromatine, où des régions activement transcrites sont décondensées, à l'hétérochromatine, la structure la plus dense qui caractérise les régions silencieuses du génome. La chromatine est assemblée lors de la réplication grâce à des complexes spécialisés appelés ACF (pour *ATP-*

utilizing chromatin assembly and remodeling factor) contenant entre autre les facteurs CAF-1 (pour chromatin assembly factor 1) et NAP-1 (pour nucleosome assembly protein 1). La protéine NAP-1 peut stimuler l'association des facteurs de transcription sur un mononucléosome par un mécanisme impliquant un déplacement des histones H2A et H2B (Walter *et al.*, 1995).

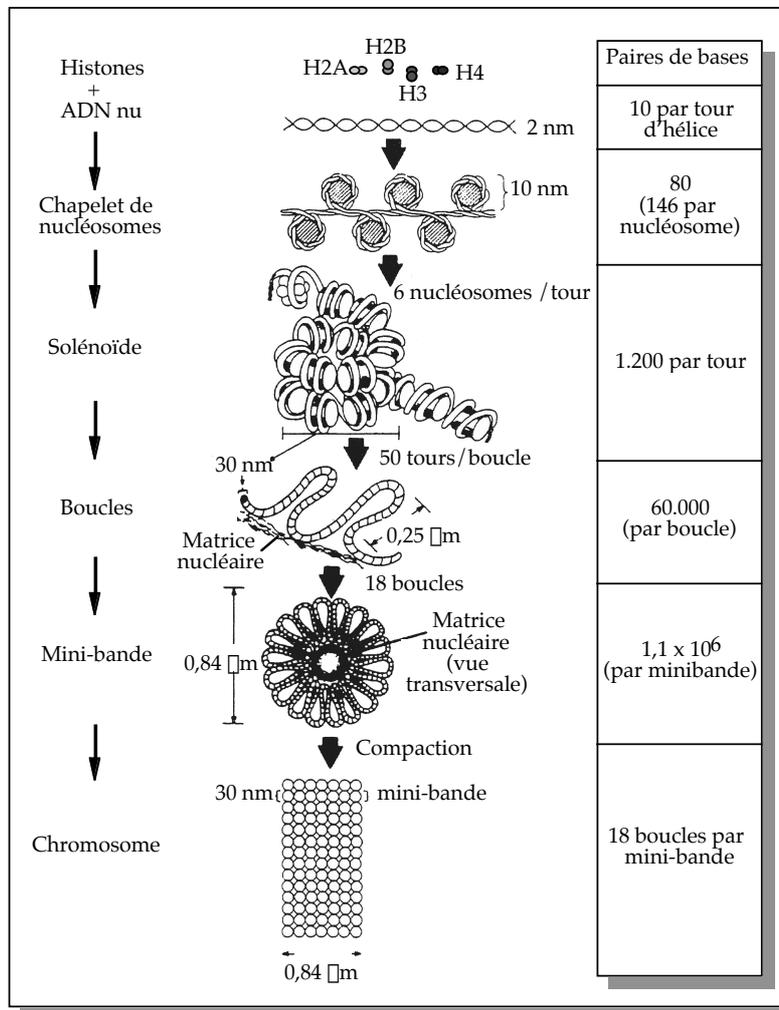


Figure 9 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN.

5.2 Modification de la chromatine

Le remodelage de la chromatine est nécessaire pour permettre la liaison des facteurs de transcription au promoteur et la progression ultérieure de l'ARNP II, et constitue un moyen de régulation supplémentaire de l'expression des gènes. La modulation de la structure chromatiniennne nécessite l'action concertée des facteurs de transcription et de complexes multiprotéiques induisant des changements conformationnels au sein des nucléosomes. Ces complexes ont pu être séparés en deux classes □ ceux modifiant covalamment les histones par

acétylation-désacétylation, phosphorylation, ubiquitinylation, méthylation (figure 8B et figure 10) ; et les complexes de remodelage qui utilisent l'énergie de l'ATP pour altérer la conformation nucléosomale (Felsenfeld et Groudine, 2003).

a) Acétylation-désacétylation

L'acétylation des histones est la modification la mieux comprise, aussi bien au niveau des résidus affectés que des conséquences sur la transcription. Plusieurs lysines de la queue amino-terminale de chacune des histones formant le nucléosome, peuvent être acétylées de façon réversible (figure 10). Les histones hyperacétylées sont associées aux régions de la chromatine activement transcrites, tandis que les histones hypoacétylées sont associées aux régions transcriptionnellement inactives (Hebbes *et al.*, 1988 ; Struhl, 1998).

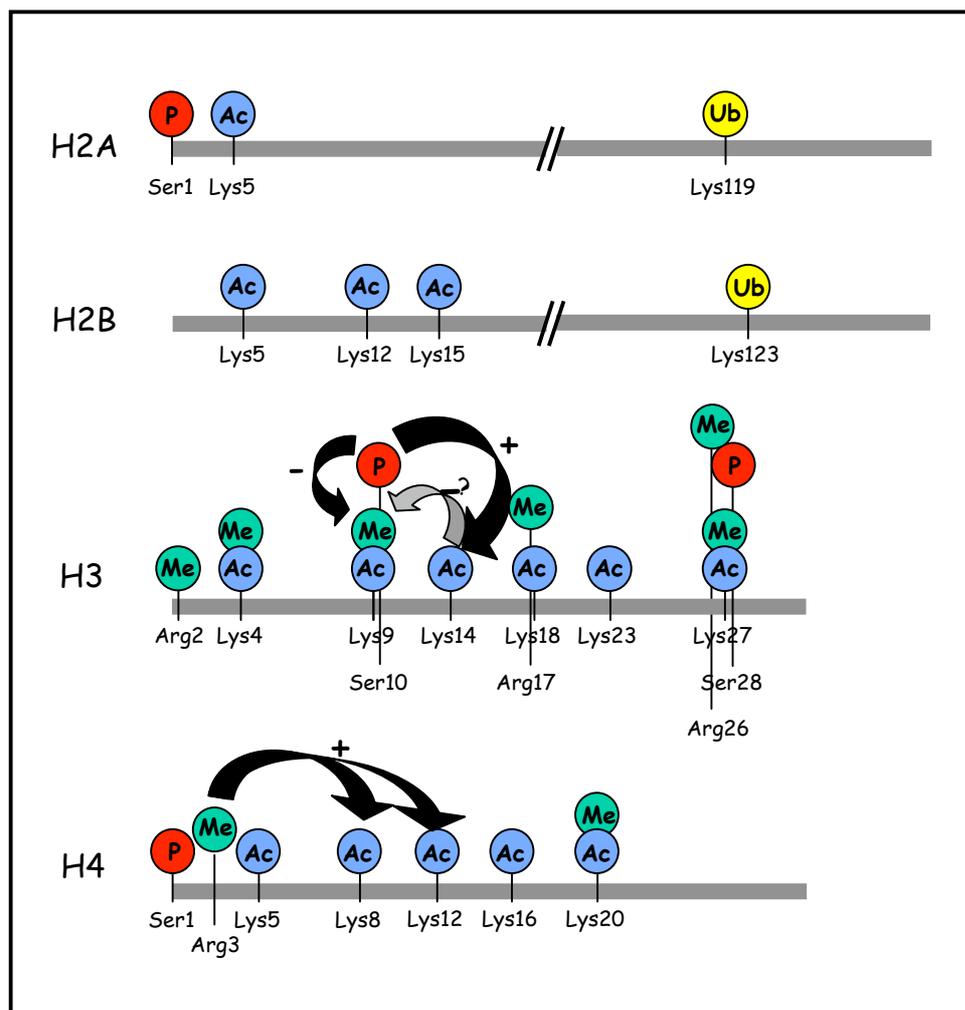


Figure 10 : Modifications covalentes des histones.

En effet, la neutralisation par l'acétyl des charges basiques portées par les lysines, réduirait la stabilité des interactions ADN-histones ce qui permettrait à la machinerie transcriptionnelle de mieux accéder à l'ADN à transcrire (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995). De plus, l'acétylation pourrait influencer l'interaction de certains facteurs de transcription avec les histones.

L'acétylation des histones est régulée par l'action concertée d'enzymes : les histones acétyltransférase (HAT) et les histones désacétylase (HDAC). Ces protéines peuvent être recrutées sur l'ADN, sous forme de complexes multiprotéiques, par des facteurs de transcription reconnaissant des séquences d'ADN spécifiques (on les nomme alors coactivateurs ou corépresseurs) ; elles peuvent également se fixer directement à l'ADN (Roth *et al.*, 2001 ; Workman et Kingston, 1998).

Les HAT peuvent être classées en deux groupes : les HAT de type A et de type B. Tandis que les HAT de type A sont localisées dans le noyau et acétylent les histones liées à l'ADN sous forme de nucléosomes, les HAT de type B se retrouvent dans le cytoplasme et acétylent les histones nouvellement synthétisées (Grant et Berger, 1999). Je ne discuterai que les HAT de type A.

De nombreux coactivateurs transcriptionnels se sont avérés posséder une telle activité acétyltransférase. On peut citer par exemple p300/CBP, PCAF ou TAFII250 (Mizzen *et al.*, 1996 ; Ogryzko *et al.*, 1998 ; Ogryzko *et al.*, 1996). Chez la levure, l'enzyme HAT la mieux caractérisée est l'homologue de PCAF : GCN5 (Brownell *et al.*, 1996 ; Kuo *et al.*, 1996). Plusieurs complexes multiprotéiques purifiés chez la levure et l'homme contiennent la protéine GCN5 associée à un ensemble de TAF du TFIID et à d'autres protéines. On peut citer : SAGA, ADA pour la levure et PCAF, TFTC et STAGA pour l'homme (Eberharter *et al.*, 1999 ; Grant *et al.*, 1998 ; Ogryzko *et al.*, 1998 ; Wiczorek *et al.*, 1998) (tableau 3). L'association de GCN5 avec ces différentes protéines pourrait donc moduler son activité HAT vis à vis des histones cibles et lui conférer une spécificité de gènes à activer. En effet, seule, GCN5 ne peut acétyler que les histones non nucléosomales (Grant *et al.*, 1999).

Complexe HAT	Sous-unités catalytique	Propriétés
hHAT1	hHAT1	Acétyle l'histone H4 libre
TFIID	TAFII250	Acétyle les histones H3 et H4 libres, GTF
TFTC	hGCN5	- Acétyle les histones H3 nucléosomales - Peut remplacer TFIID <i>in vitro</i>
STAGA	hGCN5	Ressemble à TFTC
PCAF	PCAF	- Acétyle les histones H3 nucléosomales, TFIIF, TFIIE et p53 - Interagit avec d'autres complexes HAT et certains facteurs de transcription
TFIIIC	p220, p110, p90	- Acétyle les histones H2A, H3, H4 - GTF de l'ARNP III

Tableau 3: Complexes HAT humains.

Ces gros complexes, jouant le rôle de coactivateurs transcriptionnels, peuvent être recrutés de façon promoteur spécifique par des facteurs de transcription se liant à des séquences particulières de l'ADN (voir section I.6). Par exemple, le facteur de transcription CREB peut recruter p300/CBP qui, à son tour, peut recruter PCAF, activant ainsi pleinement le gène cible de CREB par acétylation (Lee et Young, 2000). Il faut noter que les HAT sont capables d'acétyler d'autres protéines que les histones : PCAF et p300/CBP acétylent p53, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (Liu *et al.*, 1999).

A l'inverse de l'acétylation, la désacétylation des histones provoquerait une compaction de la chromatine. Chez l'homme, huit histones désacétylases (HDAC) ont été identifiées pouvant être classées en deux groupes : les HDAC de classe I (HDAC1-3 et HDAC8, homologues à RPD3 de levure) et les HDAC de classe II (HDAC4-7, homologues à HDA1 de levure) (Bertos *et al.*, 2001 ; Hu *et al.*, 2000). Comme les HAT, les HDAC se retrouvent associées à d'autres protéines dans de gros complexes macromoléculaires. Cette association affecte aussi bien la spécificité de substrat des HDAC que leur interaction avec des répresseurs de la transcription (Zhang *et al.*, 1998). Deux complexes corépresseurs bien caractérisés, Sin3 et NURD, contiennent deux activités HDAC (HDAC1 et 2) et des protéines liant les histones (RBAP46 et 48) (Knoepfler et Eisenman, 1999 ; Zhang *et al.*, 1999). L'activité de désacétylation des histones par HDAC1/HDAC2 du complexe Sin3 est essentielle à l'activité de corépression de ce complexe

(Hassig *et al.*, 1997). Comme les complexes HAT, les complexes HDAC sont capables d'interagir avec de multiples facteurs transcriptionnels liant l'ADN (répresseurs), reflétant ainsi un mode de régulation pour la répression de certains gènes ou groupe de gènes (Knoepfler et Eisenman, 1999).

En plus de modifier la structure chromatinienne, l'acétylation des histones pourrait constituer un marquage pour le recrutement d'autres protéines. Les résidus Lys acétylés peuvent en effet être reconnus par un motif d'environ 110 acides aminés, appelé bromodomaine, et présent dans PCAF, p300/CBP et TAFII250 (Dhalluin *et al.*, 1999 ; Hudson *et al.*, 2000). Cette acétylation pourrait donc constituer un signal, reconnu par ces facteurs, qui permettrait par exemple le recrutement de TFIID et l'assemblage et/ou la stabilisation du PIC autour du promoteur ainsi marqué (Naar *et al.*, 2001).

b) Phosphorylation, ubiquitinylation, méthylation

La queue amino-terminale des histones peut être modifiée par phosphorylation (figure 10). Cette phosphorylation serait impliquée dans la condensation des chromosomes durant la mitose, mais aussi dans l'activation de la transcription (Koshland et Strunnikov, 1996 ; Thomson *et al.*, 1999). Plusieurs kinases spécifiques des histones, comme Rsk2 et Msk1 sont associées à des sites actifs de la transcription (Sassone-Corsi *et al.*, 1999). De plus, des cellules déficientes pour la kinase Rsk2 montrent un défaut d'activation de la transcription (De Cesare *et al.*, 1998). Un lien entre phosphorylation des Ser et acétylation des Lys adjacentes sur les histones pourrait permettre l'activation de la transcription de certains gènes. En effet, les histones H3 dans les régions transcriptionnellement actives sont modifiées par phosphorylation et acétylation. De plus, cette phosphorylation active l'acétylation de l'histone H3 (Cheung *et al.*, 2000). Enfin, des promoteurs dépendants de l'activité HAT de GCN5 requièrent aussi la phosphorylation de la Ser 10 pour l'activation de la transcription (Lo *et al.*, 2000).

Les histones H2A et H2B peuvent aussi être ubiquitinylées de manière réversible (figure 10). L'ubiquitinylation se retrouve dans les régions transcriptionnellement actives de l'ADN (Davie et Murphy, 1990). Cette modification semblerait perturber la structure du nucléosome, facilitant ainsi la fixation de facteurs de transcription à la chromatine (Spencer et Davie, 1999). En effet, l'ubiquitinylation de l'histone H2B diminue à la fois son affinité de liaison à l'ADN, l'association des histones H2A et H2B au nucléosome et la liaison de l'histone H1 (Robzyk *et al.*,

2000). De plus, TFIID possède une activité d'ubiquitylation envers l'histone H1; cette ubiquitylation semblerait activer la transcription (Pham et Sauer, 2000).

L'effet de la méthylation des histones sur la transcription est mal connu. Il existe 2 types de méthylation des Arg ou des Lys. La méthylation des Arg est impliquée dans l'activation de la transcription. En effet, en présence de l'activité HAT de p300, l'HMT CARM1 active l'expression de certains gènes contrôlés par des récepteurs nucléaires (Ma *et al.*, 2001). CARM1 jouerait le rôle de coactivateur transcriptionnel (Wang *et al.*, 2001). Par contre, la méthylation des Lys serait impliquée dans la répression de la transcription. En effet, l'HMT SUV39H1 fut initialement localisée dans des régions transcriptionnellement inactives (hétérochromatine) (Rea *et al.*, 2000 ; Tschiersch *et al.*, 1994). La méthylation de l'histone H3 par cette HMT permet le recrutement de HP1, connu pour être un répresseur transcriptionnel (Bannister *et al.*, 2001). La méthylation des histones pourrait aussi influencer la méthylation de l'ADN connue pour réprimer l'expression des gènes (Li, 2002). Il n'est cependant pas clair que la méthylation des Lys ne soit que répressive, néanmoins elle joue un rôle prépondérant dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes. De plus, de récentes études ont montré que cette méthylation pourrait se faire pendant l'étape d'élongation de la transcription *via* le CTD de l'ARNP II (Hampsey et Reinberg, 2003).

c) Modifications non covalentes de la chromatine

En plus des modifications covalentes citées précédemment, les nucléosomes peuvent subir des remodelages conformationnels dépendants de l'ATP (Vignali *et al.*, 2000). Tous les facteurs de remodelage de la chromatine (FRC) identifiés jusqu'à maintenant sont de gros complexes multiprotéiques comprenant une sous-unité à activité ATPase hautement conservée (de la superfamille des Swi/Snf2), ainsi que des sous-unités affectant l'efficacité et la spécificité de cette ATPase. Les FRC humains peuvent être classés en 3 groupes suivant la sous-unité ATPasique qu'ils contiennent: SWI/SNF, ISWI et un groupe moins bien étudié Mi-2-CHD1 (Lusser et Kadonaga, 2003). Les mécanismes par lesquels les FRC utilisent l'ATP pour remodeler la chromatine sont mal connus. Il semblerait que les FRC soient capables de casser et de reformer les contacts histones-ADN en introduisant, par exemple, des torsions superhélicoïdales dans l'ADN et/ou la chromatine. Cependant, le spectre d'action des FRC sur les nucléosomes semble assez large (Lusser et Kadonaga, 2003).

Il est intéressant de noter que le remodelage de la chromatine par ces FRC peut conduire à des conformations chromatiniennes positives ou négatives pour la transcription. En effet, l'inactivation du FRC SWI/SNF de levure peut aussi bien réprimer ou activer l'expression des différents gènes étudiés (Hirschhorn *et al.*, 1992 ; Sudarsanam *et al.*, 2000). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les FRC, en remodelant la chromatine, augmentent l'accessibilité de l'ADN aussi bien pour les activateurs que pour les répresseurs de la transcription. La fonction et la spécificité de substrat peuvent varier entre les différents groupes de FRC mais aussi parmi les facteurs au sein de ces groupes. Par exemple, le groupe des ISWI permet d'ordonner les nucléosomes sur un brin d'ADN, mais le taux d'espacement entre les nucléosomes peut varier d'un complexe ISWI à un autre.

Le complexe SWI/SNF de levure est le FRC le plus étudié à ce jour. Il peut être recruté sur des gènes spécifiques par des facteurs liant l'ADN tel que nombre de récepteurs nucléaires (Dilworth *et al.*, 2000 ; DiRenzo *et al.*, 2000). De plus, il existe une coopération entre l'acétylation des histones et leur remodelage : le recrutement du complexe HAT précède celui du complexe FRC, ce qui permet une synergie dans l'activation de la transcription du gène cible (Dilworth *et al.*, 2000 ; DiRenzo *et al.*, 2000). Même si l'ordre de recrutement de ces complexes peut différer d'un système étudié à un autre, il est clair que les activités de remodelages et de modifications de la chromatine agissent de concert pour réguler de façon précise un gène donné en réponse à un activateur donné.

6. La régulation de la transcription

Comme chaque cellule possède la même information génétique, la détermination des gènes devant être exprimée à tel instant et en réponse à tel ou tel stimulus est cruciale pour la différenciation et le développement. L'activation transcriptionnelle d'un gène donné est généralement dû à la liaison d'activateurs de la transcription sur des séquences spécifiques d'ADN, permettant ainsi le recrutement de la machinerie de transcription et/ou des complexes modifiant la chromatine. La régulation de l'expression génétique implique un dialogue finement régulé entre activateurs, répresseurs et cofacteurs de la transcription.

6.1 Les activateurs

Les activateurs sont généralement constitués de 2 domaines : un liant une séquence spécifique du promoteur et l'autre recrutant ou stimulant l'activité de la machinerie transcriptionnelle (Triezenberg, 1995). Le domaine de liaison à l'ADN peut être regroupé en

plusieurs familles, et sa structure a pu être déterminée par analyses cristallographique et par RMN (Harrison, 1991). Un activateur peut servir à activer plusieurs gènes, permettant le contrôle coordonné de ces gènes. Un même gène peut être activé par plusieurs activateurs, formant ainsi 'l'enhanceosome'. Ceci est tout aussi vrai pour les répresseurs. L'arrangement des sites de liaison dans l'enhancer, les interactions protéine-protéine entre les activateurs et l'addition de facteurs structuraux contribuent à la stabilité et la fonction de l'enhanceosome. L'arrangement de plusieurs activateurs au sein d'un même complexe permet l'intégration de plusieurs signaux de régulation en une seule étape.

Les activateurs peuvent agir suivant plusieurs mécanismes (figure 11).

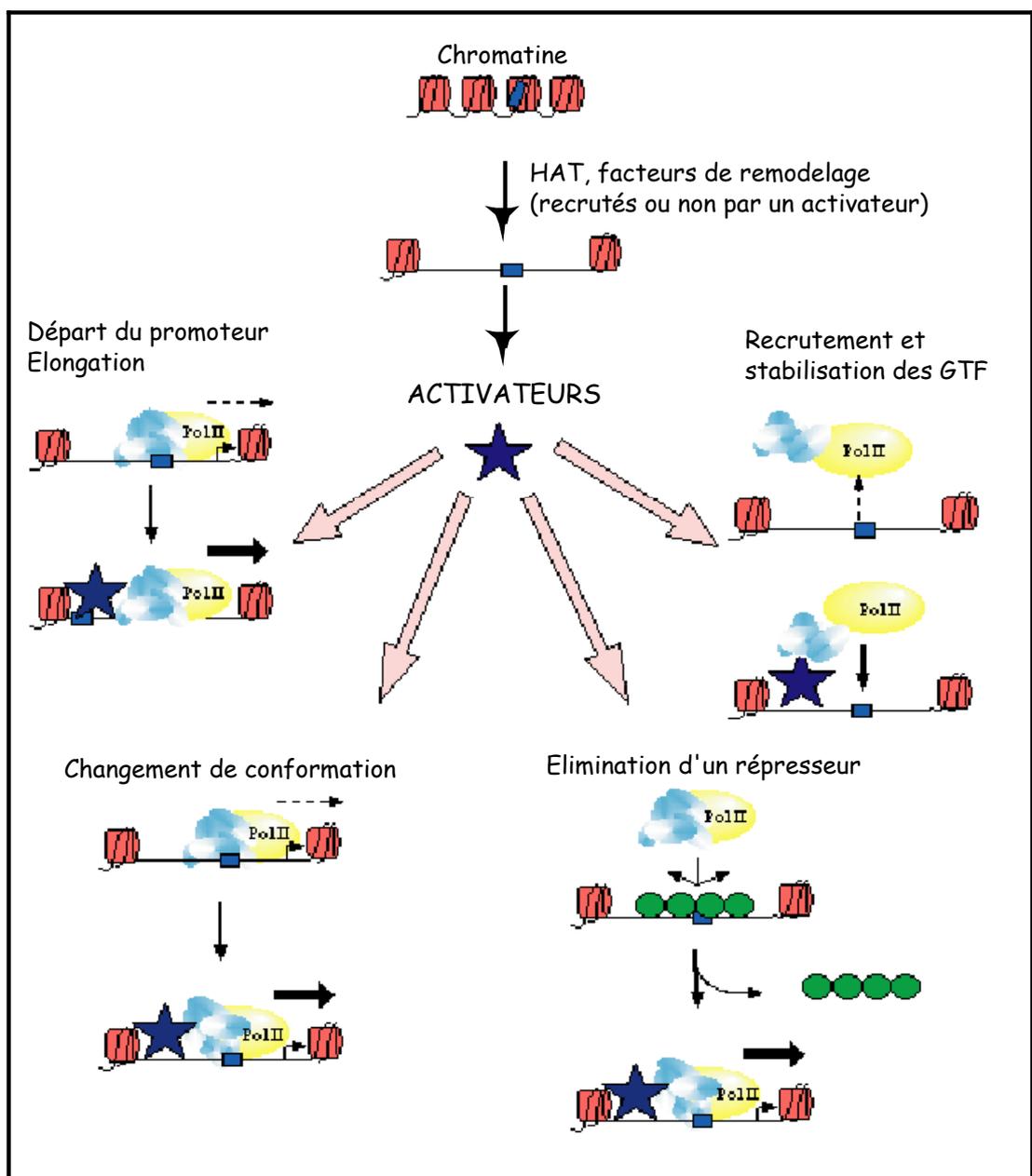


Figure 11 : Mode d'action des activateurs de la transcription.

De nombreux activateurs peuvent recruter des complexes (coactivateurs) remodelant la chromatine tel que SWI/SNF, PCAF ou TFTC facilitant ainsi la formation du complexe de transcription sur la chromatine relâchée (Hardy *et al.*, 2002 ; Neely *et al.*, 2002 ; Utley *et al.*, 1998). Une variété de coactivateurs possède une activité de modification de l'ADN, montrant l'importance de ce mécanisme dans l'activation de la transcription (Brown *et al.*, 2000). Les activateurs peuvent aussi recruter directement la machinerie de transcription en interagissant avec les GTF et l'ARNP II (Ptashne et Gann, 1997). Ce mécanisme semble crucial dans l'activation de la transcription car il est possible d'activer artificiellement un gène en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN d'un activateur directement à un des éléments de la machinerie de transcription (Keaveney et Struhl, 1998 ; Struhl *et al.*, 1998). De plus, il a pu être montré que des activateurs tel que les récepteurs nucléaires (RAR) interagissaient directement avec TFIIF qui en retour phosphorylait cet activateur pour le rendre actif et donc capable de recruter des coactivateurs tel que les HAT (Keriel *et al.*, 2002). Enfin, les activateurs peuvent stimuler différentes étapes de la transcription comme l'échappée du promoteur et l'élongation (Brown *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2001b) (figure 11). Par exemple, l'activateur HIV-1 stimule la processivité de l'ARNP II (Garber et Jones, 1999).

6.2 Les répresseurs

La variété de répresseurs et leur grande conservation au point de vue évolutif montrent que le mécanisme de régulation négative de la transcription est crucial pour la cellule. Il existe plusieurs modes d'action de la répression : compétition de liaison à l'ADN avec un activateur, interaction avec la machinerie de transcription et recrutement de corépresseurs tel que les complexes HDAC. Les répresseurs peuvent être classés en 2 groupes : les répresseurs généraux ou spécifiques d'un gène donné.

Plusieurs répresseurs généraux, tel que Mot1 et NC2, fonctionnent en interagissant directement avec TBP. En effet, Mot1 dissocie TBP de la boîte TATA et NC2, toujours en interagissant avec TBP, empêche le recrutement de TFIIB ou de l'holoenzyme (Auble *et al.*, 1994 ; Goppelt *et al.*, 1996).

Les répresseurs spécifiques agissent en liant directement les activateurs transcriptionnels ou en entrant en compétition avec leur site de liaison à l'ADN. Par exemple, l'interaction de la protéine chaperonne Hsp90 avec l'activateur Hsf1 empêche sa liaison à l'ADN ; la protéine Gal80 réprime l'activateur de la transcription Gal4 en interagissant directement avec

son domaine de liaison à l'ADN (Sil *et al.*, 1999 ; Zou *et al.*, 1998). La compétition avec le site de liaison à l'ADN a aussi été montré pour le répresseur Acr1 liant ATF/CREB (Vincent et Struhl, 1992). Enfin, certains répresseurs spécifiques, tel que Ssn6-Tup1, agissent en ciblant directement la machinerie de transcription (Wahi *et al.*, 1998).

Des études génétiques chez la levure ont permis de montrer que la régulation de l'expression génique implique un équilibre entre l'action des régulateurs positifs et négatifs de la transcription. En effet, une déficience d'un activateur transcriptionnel peut être compensée par la perte de fonction d'un répresseur, et vice versa. Par exemple, la mutation thermosensible du gène *SRB4* peut être compensée par une mutation dans le répresseur NC2 (Lee *et al.*, 1998). De même, une déficience de ce même répresseur NC2 peut être compensée par une perte de fonction du médiateur Sin4 (Kim *et al.*, 2000a).

Enfin, il faut noter qu'il existe des complexes faisant le lien entre les activateurs ou les répresseurs et la machinerie transcriptionnelle. Ces complexes sont nommés coactivateurs ou corépresseurs, respectivement. Sans les coactivateurs il n'est pas possible de reconstituer une réaction de transcription *in vitro* dépendante des activateurs. Les complexes médiateurs humains TRAP/SMCC, les différents complexes à activité HAT ou les FRC sont des coactivateurs, tandis que les complexes à activité histone désacétylase sont des corépresseurs. Les cofacteurs, ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, sont recrutés par des activateurs ou des répresseurs et permettent de relayer les signaux de ces derniers à la machinerie de transcription.

CHAPITRE II : REPARATION DE L'ADN PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES

L'ADN contient l'information nécessaire au développement, au fonctionnement et à la reproduction de chaque organisme. A l'échelle de la cellule, des altérations affectant la structure ou l'intégrité des molécules d'ADN empêchent le bon déroulement de processus comme la transcription ou la réplication. Il peut alors en résulter un arrêt de la croissance cellulaire, la mort cellulaire ou une instabilité génomique. Au niveau de l'organisme, ces lésions ont été impliquées dans de nombreuses maladies génétiques héréditaires, dans la carcinogenèse, dans l'apparition de désordres génétiques ou encore dans le processus de vieillissement. Néanmoins de telles lésions peuvent, dans certains cas, créer des mutations favorables à l'adaptation d'un organisme dans un environnement donné, montrant l'importance des lésions au point de vue évolutif.

Les lésions de l'ADN peuvent avoir lieu spontanément à cause de l'instabilité des liens chimiques de l'ADN (désamination, dépurination) ou peuvent être induites par des irradiations ou par des composés chimiques. Elles peuvent être de différents types, incluant des cassures sur un ou sur les deux brins d'ADN induites par les rayons X, des pontages inter ou intrabrin induits par divers agents chimiques comme le cisplatine, diverses modifications de base causées par des agents oxydatifs. Des modifications au niveau des bases de l'ADN peuvent également avoir des causes endogènes, comme les dommages oxydatifs générés par les radicaux libres du métabolisme cellulaire.

Afin d'éviter l'accumulation de dommages sur l'ADN, la cellule dispose d'une batterie de mécanismes de réparation (Friedberg, 2003 ; Hoeijmakers, 2001) (figure 12). On peut citer en exemple les mécanismes de recombinaison homologue et de jonction des extrémités (*end-joining*), qui réparent les coupures double-brin, le mécanisme d'excision de bases (BER), qui répare les bases modifiées par oxydation, alkylation ou méthylation, et la voie d'excision-resynthèse d'oligonucléotides (NER), qui agit principalement sur les lésions qui induisent une forte torsion de la double hélice d'ADN.

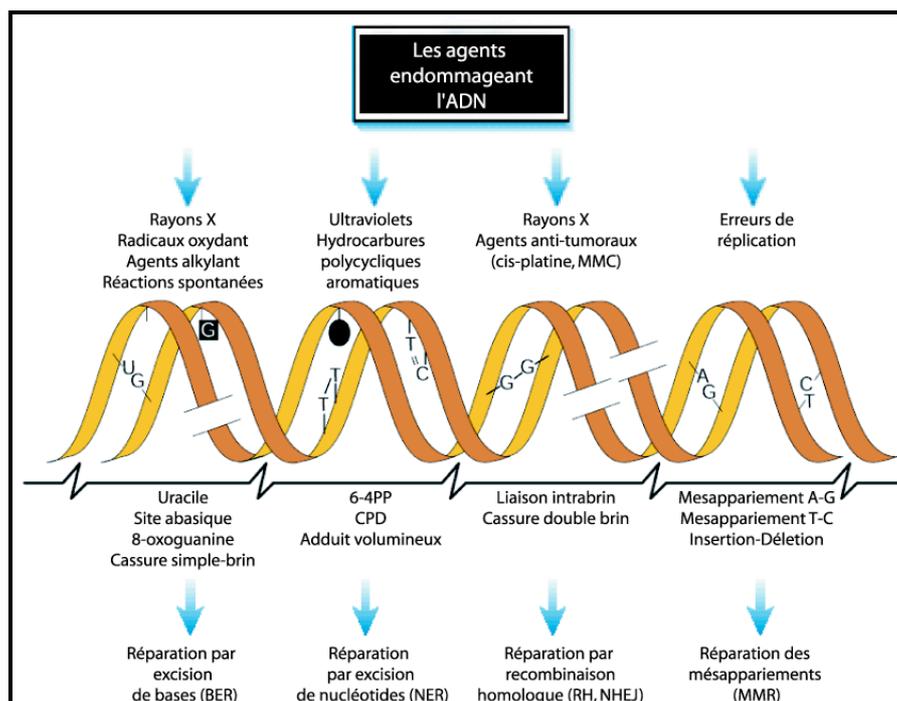


Figure 12: Les différents mécanismes de réparation de l'ADN. (D'après (Hoeijmakers, 2001)).

Toutefois, une lésion donnée peut être réparée par différentes voies et plusieurs voies de réparation ont des facteurs en commun (Lindahl *et al.*, 1997). La NER est responsable de la réparation d'une grande variété de dommages causés à l'ADN, comme les lésions induites par les rayons UV ou le cisplatine. Dans ce chapitre, je décrirai les différentes étapes de la NER et les facteurs impliqués pour ensuite discuter des maladies associées à ce mécanisme.

1. Mécanisme moléculaire de la NER

1.1 Lésions reconnues par la NER

La NER est le mécanisme de réparation de l'ADN le plus flexible dans le sens où il est capable d'éliminer une vaste panoplie de lésions non apparentées structuralement. Les dimères de cyclobutane (CPD pour *cyclobutane pyrimidine dimer*) et les photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) générés par les rayons UV sont les principaux substrats de la NER. Les dommages causés par les hydrocarbures polycycliques aromatiques contenus dans les produits de combustion (fumée des cigarettes, barbecues) ainsi que les liaisons intrabrin formées par des composés chimiques comme l'anticancéreux cisplatine et par certains métabolites cellulaires, sont également de bons substrats de la NER (figure 13). Bien que structuralement et

chimiquement différents, les adduits volumineux formés par ces composés modifient la chimie du brin endommagé et induisent une torsion de la double hélice d'ADN perturbant ainsi l'appariement entre les bases (Batty et Wood, 2000).

Chaque lésion est réparée avec une efficacité variable, qui reflète l'affinité avec laquelle la machinerie de NER reconnaît un adduit particulier. Cette reconnaissance est d'autant plus efficace que la torsion de l'ADN est importante. Ainsi, la réparation des lésions 6-4PP, qui courbent l'ADN de 44°, est cinq à dix fois plus rapide que celle des CPD, moins distordants (9°), bien que les CPD soient plus abondants (Kim *et al.*, 1995).

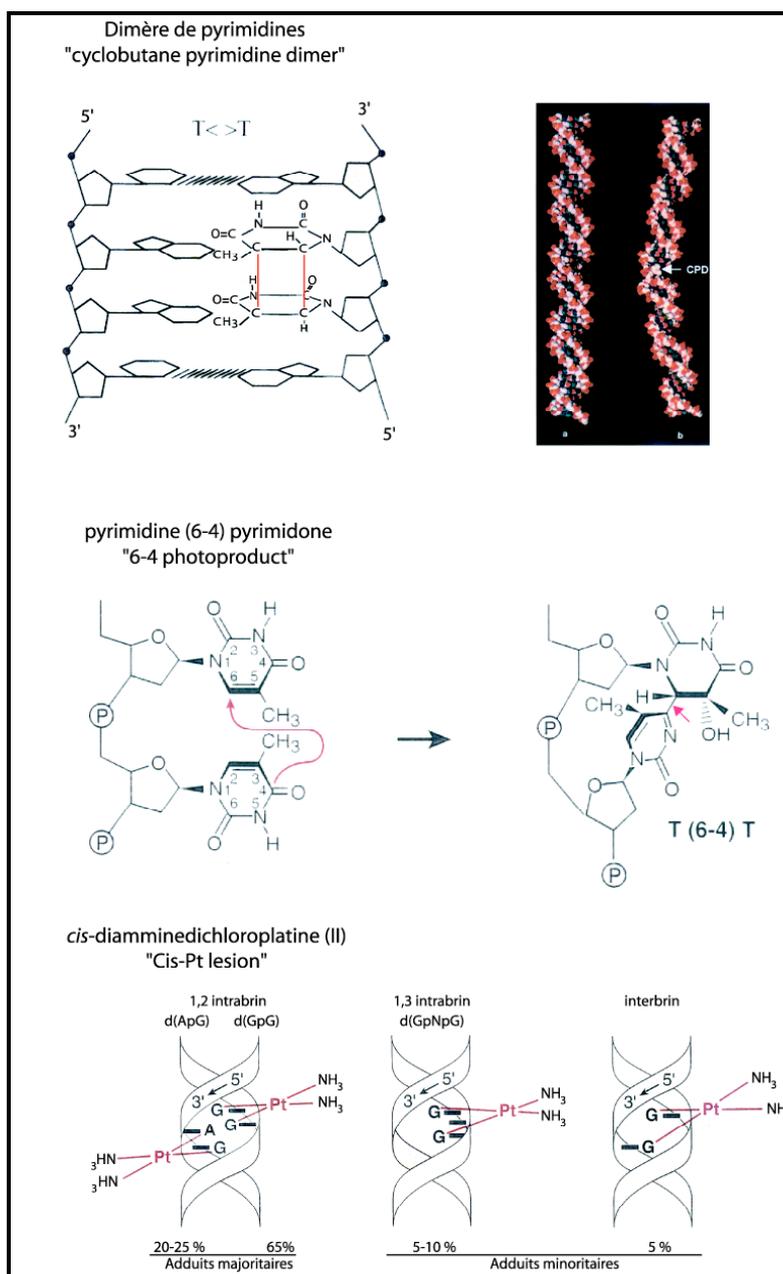


Figure 13: Exemples de lésions réparées par NER.

Une torsion de l'ADN ainsi qu'un changement de sa chimie sont nécessaires à la production d'un bon substrat pour la NER. En effet, une lésion cisplatine intrabrin 1,3 GTG est mieux réparée qu'une lésion intrabrin 1,2 GG \square mais l'ajout d'un T non complémentaire en face de la lésion 1,2 GG permet une réparation équivalente à la lésion 1,3 GTG (Moggs *et al.*, 1997).

1.2 Les étapes de la NER et les facteurs associés

Le processus de la réparation par la NER met en action plus de 20 protéines différentes dans les étapes successives que sont \square 1) la reconnaissance de la lésion, 2) l'ouverture locale de la double hélice d'ADN, 3) l'incision du brin endommagé de chaque côté de la lésion suivie de 4) son excision complète, 5) la resynthèse du brin d'ADN et enfin, 6) la ligation du dernier nucléotide incorporé à l'ADN préexistant. Les 4 premières étapes sont regroupées sous le terme de double incision alors que les 2 dernières étapes sont nommées resynthèse de l'ADN.

Ce mécanisme a été élucidé grâce aux études menées chez la levure et à la reconstitution de la réaction *in vitro* qui a permis la caractérisation de six facteurs généraux de réparation, pour certains, composés de multiples sous-unités et nécessaires à l'étape de double incision (Aboussekhra *et al.*, 1995 ; Mu *et al.*, 1995) (tableau 4). Ces protéines sont XPA, l'hétérotrimère RPA, le complexe XPC-hHR23B, le complexe TFIIH ainsi que les deux endonucléases : XPG et l'hétérodimère ERCC1-XPF. Une fois la lésion éliminée, la brèche ainsi créée est ensuite comblée par une ADN polymérase, aidée des facteurs RFC, PCNA et RPA, et l'ADN nouvellement synthétisé est scellé par une ADN ligase. Des mutations dans certains de ces facteurs sont responsables de maladies génétiques rares que sont \square le *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD) (voir section II.4). On peut distinguer 2 voies différentes dans la NER \square la réparation des lésions situées au hasard sur le génome (GGR) et la réparation des lésions situées sur le brin transcrit des gènes actifs (TCR) (voir section II.2).

Facteur de la double incision	Sous-unités	Propriétés
XPA		- Impliqué dans la reconnaissance de la lésion - Muté chez les patients atteints de XP
RPA	RPA14, 32, 70	Impliqué dans la reconnaissance de la lésion et la resynthèse
XPC-hHR23B	XPC, hHR23B	- Impliqué dans la reconnaissance de la lésion - Non requis pour la TCR - Muté chez les patients atteints de XP
XPG		- Endonucléase nécessaire à l'incision en 3' de la lésion - Muté chez les patients atteints de XP et XP/CS
ERCC1-XPF	ERCC1, XPF	- Endonucléase nécessaire à l'incision en 5' de la lésion - Muté chez les patients atteints de XP
TFIIH	voir chapitre III	- Nécessaire à l'ouverture de l'ADN autour de la lésion - Muté chez les patients atteints de XP, XP/CS et TTD

Tableau 4: Facteurs humains nécessaires à la double incision.

Comme décrit ci-dessus le mécanisme de NER peut être décomposé en plusieurs étapes (Costa *et al.*, 2003) (figure 14). La première étape, qui est la reconnaissance de la lésion diffère entre la GGR et la TCR. Cette reconnaissance débute avec la formation d'un complexe de double incision composé des 6 facteurs généraux de réparation cités plus haut. Bien que le mode d'arrivée de ces facteurs soit incertain, il est de plus en plus accepté que ceux-ci s'assemblent sur la lésion de manière séquentielle plutôt qu'en une seule étape sous forme d'un complexe 'repairoosome' (Houtsmuller *et al.*, 1999 ; Riedl *et al.*, 2003 ; Volker *et al.*, 2001). Une fois le complexe de double incision formé, l'ADN se retrouve ouvert autour de la lésion ce qui permet la double incision du brin d'ADN contenant cette lésion. Le complexe de double incision est ensuite écarté de l'ADN permettant ainsi l'assemblage du complexe de resynthèse constitué de RPA, RFC, PCNA, l'ADN polymérase α/δ et l'ADN ligase I.

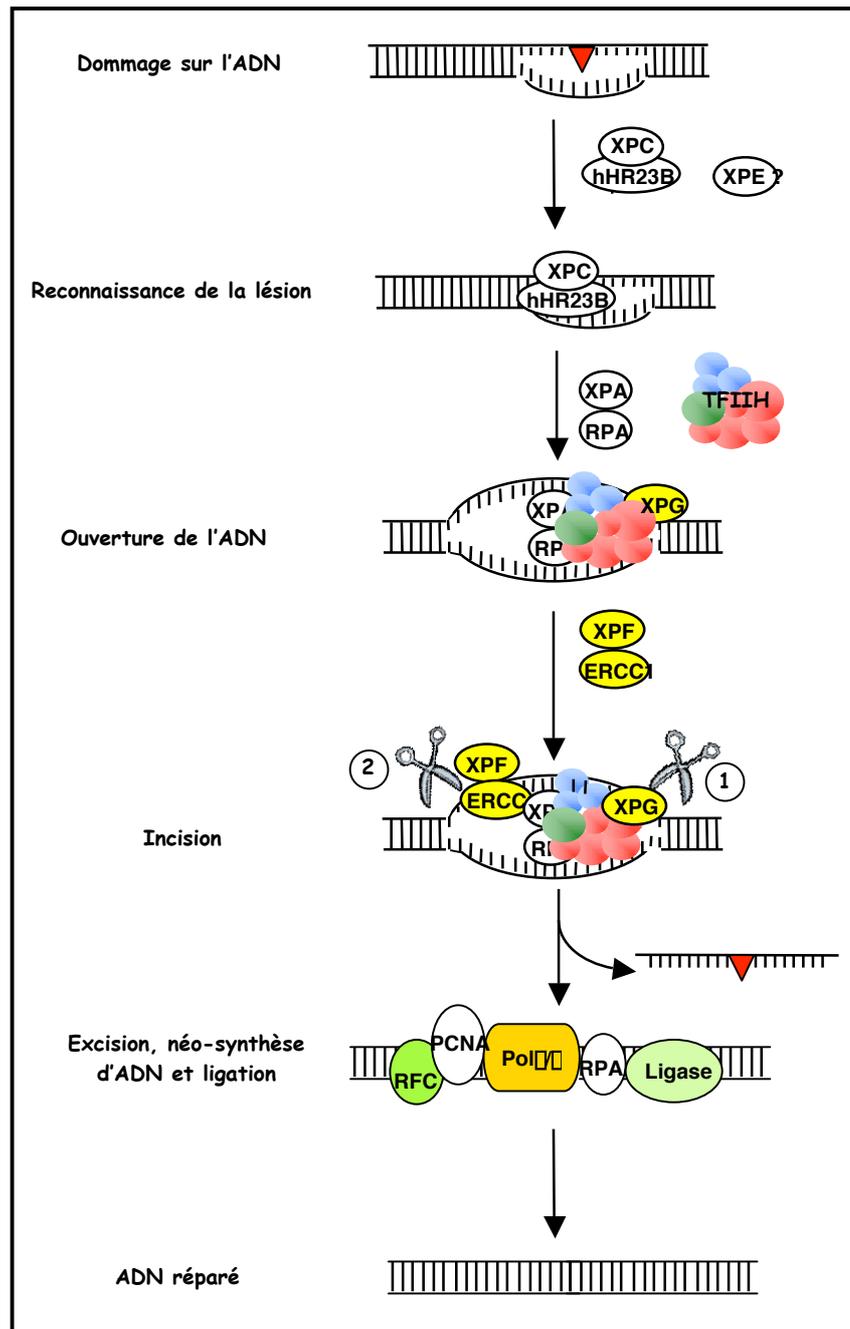


Figure 14 □: Les différentes étapes de la NER.

a) La double incision

Reconnaissance de la lésion

Différentes données ont récemment démontré que la protéine XPC initie le mécanisme de NER (Janicijevic *et al.*, 2003b ; Sugasawa *et al.*, 1998). Le groupe de Mullenders a mis en évidence *in vivo* que l'assemblage séquentiel sur l'ADN lésé des 6 facteurs nécessaires à la double incision est aboli lorsque la protéine XPC est mutée (Volker *et al.*, 2001). XPC forme un

complexe avec hHR23B qui stabilise sa fixation à l'ADN et le protège de la dégradation par le protéasome (Ng *et al.*, 2003). Ce complexe reconnaît principalement la rupture d'appariement de bases induite par la torsion de la double hélice. Ainsi, les petites bulles simple brin synthétisées artificiellement et les mésappariements dus aux erreurs de la machinerie de réplication (normalement réparés par le système de réparation des mésappariements) sont de bons substrats pour XPC-hHR23B. Ces structures ne sont néanmoins pas réparées par la NER. La reconnaissance du site endommagé nécessite probablement la vérification de la présence d'une lésion par XPA après assemblage total ou partiel du complexe de réparation et ouverture de la double hélice autour de cette lésion. Il a en effet été suggéré que la reconnaissance du site endommagé par XPA était facilitée par la localisation de la lésion dans une structure simple brin (Batty et Wood, 2000).

Le groupe de Sancar a démontré que la réparation *in vitro* de certains ADN endommagés partiellement ouverts ne nécessite pas le complexe XPC-hHR23B (Mu et Sancar, 1997). Or, la fixation de ce complexe accentue la courbure de l'ADN de 39° (Janicijevic *et al.*, 2003b). L'un des rôles de XPC-hHR23B est probablement de favoriser la rupture des appariements de bases autour du dommage en courbant l'ADN et de former une structure pré-ouverte. Il faut enfin noter que XPE (non nécessaire à la NER *in vitro*) pourrait aussi reconnaître les lésions mal reconnues par XPC, mais son rôle précis n'est pas clair (Costa *et al.*, 2003).

Ouverture de la double hélice d'ADN

L'ouverture locale et asymétrique de la double hélice autour du dommage est assurée par TFIIH. Ce facteur multiprotéique est recruté grâce à sa forte interaction avec XPC (Araujo *et al.*, 2001). TFIIH est composé de neuf sous-unités et possède deux hélicases XPB et XPD de polarité opposée (respectivement 3'-5' et 5'-3'). L'activité de ces hélicases requiert l'hydrolyse d'ATP, mais également l'existence d'une zone désappariée (ADN simple brin) générée par le dommage et par la courbure de l'ADN due à XPC-hHR23B (Caruthers et McKay, 2002). XPB et XPD initient la formation d'un complexe dit 'ouvert' s'étendant sur 30 paires de bases autour de la lésion (Evans *et al.*, 1997). L'ouverture de l'ADN par TFIIH est facilitée par le complexe hétérotrimérique RPA qui se lie avec une polarité définie au brin non endommagé (Wold, 1997). La taille optimale de fixation d'une molécule de RPA à un ADN simple brin (30 nucléotides) correspond d'ailleurs à la taille du complexe ouvert.

RPA et XPA se lient à l'ADN de façon coopérative. XPA se fixe sur le brin endommagé et assure le positionnement correct de TFIIH sur la bulle. Il est probable que XPA vérifie la

présence du dommage, sachant qu'il lie différentes lésions tel que le cisplatine. Cette protéine joue un rôle central dans l'assemblage du complexe de réparation, puisqu'elle interagit avec TFIIH, RPA, XPG et ERCC1 (Batty et Wood, 2000).

Double incision

Après l'ouverture locale et la vérification de la lésion, les endonucléases XPG et XPF clivent le brin lésé au niveau des jonctions ADN simple et double brin, respectivement en 3' et 5' du dommage (Wood, 1997). Il existe une forte interaction entre XPG, TFIIH et XPC-hHR23B. TFIIH et XPG forment un complexe relativement stable (Araujo *et al.*, 2001). *In vivo*, le recrutement de XPG sur le site endommagé est indépendant de XPA, mais n'est plus assuré lorsque XPC ou TFIIH sont défectueux (Volker *et al.*, 2001). TFIIH est donc impliqué dans le positionnement de l'endonucléase XPG et pourrait, à l'aide de l'interaction entre cette dernière et RPA, diriger la coupure en 3' du brin lésé. De plus, l'activité ATPase de TFIIH est stimulée par XPA et XPC-hHR23B, ce qui permet à TFIIH d'activer les endonucléases XPG et XPF de façon dépendante de l'ATP (Winkler *et al.*, 2001).

XPG joue un rôle dans l'ouverture optimale autour de la lésion en stabilisant le complexe intermédiaire formé de XPC-hHR23B, TFIIH, XPA et RPA (Mu *et al.*, 1997). Pour cette raison, la coupure en 3' précède toujours la coupure en 5' par XPF-ERCC1.

Le complexe XPF-ERCC1, probablement recruté *via* ses interactions avec XPA et RPA, est le dernier facteur à joindre le complexe de double incision (Riedl *et al.*, 2003). La spécificité de coupure du brin endommagé par XPF-ERCC1 est assurée grâce à son interaction avec RPA, qui se lie à l'ADN de façon polarisée et protège le brin non endommagé (de Laat *et al.*, 1998).

La base endommagée détermine le brin sur lequel sont effectuées les incisions. Celles-ci sont asymétriques : 2 à 8 nucléotides en 3' du dommage et 15 à 24 nucléotides en 5' (Mu *et al.*, 1996). Cette asymétrie de coupure est probablement liée à l'asymétrie d'ouverture de la double hélice. La taille du fragment excisé dépend en partie de la lésion considérée et de la séquence nucléotidique entourant la base endommagée (Shivji *et al.*, 1999). Ce fragment est excisé par un mécanisme qui reste à définir. *In vitro*, aucun des six facteurs de la double incision ne reste associé à cet oligonucléotide après excision.

Alors que la plupart des facteurs impliqués dans la double incision sont relargués une fois la coupure en 5' effectuée, RPA reste associé de façon stable au brin non endommagé jusqu'à l'arrivée des facteurs de resynthèse (Riedl *et al.*, 2003).

b) La resynthèse

Bien que les étapes de double incision (reconnaissance, ouverture, coupure) et de resynthèse aient été reconstituées séparément *in vitro*, il est probable qu'elles soient intimement associées *in vivo* et que le remplacement du fragment contenant la lésion débute immédiatement après son excision.

In vitro, l'étape de resynthèse nécessite les facteurs RPA, RFC et PCNA mais aussi l'ADN polymérase α (Shivji *et al.*, 1995). RPA, qui reste lié au brin non endommagé après la double incision, pourrait promouvoir le recrutement des facteurs RFC et PCNA (Yuzhakov *et al.*, 1999). Il est possible que XPG participe également au recrutement de PCNA. RFC reconnaît l'extrémité 3'-OH générée par XPF-ERCC1 et facilite l'ancrage de PCNA à l'ADN. Ce dernier sert de plate-forme à la polymérase et augmente sa processivité.

L'étape finale de la NER consiste en la liaison de l'extrémité 5' de l'ADN néosynthétisé à la matrice originale. Cette réaction est probablement effectuée par l'ADN ligase I, puisque certaines mutations dans le gène codant cette protéine sont responsables d'un phénotype de sensibilité aux rayons UV chez la levure (Prigent *et al.*, 1994).

2. La transcription couplée à la réparation (TCR)

Différentes lésions distordant la double hélice d'ADN peuvent bloquer la progression de l'ARNP II lorsque celles-ci se trouvent sur le brin transcrit de l'ADN. De telles lésions sont réparées plus rapidement que des dommages situés n'importe où ailleurs sur le génome (Bohr *et al.*, 1985). La réparation de ces lésions bloquantes est assurée par un système nommé TCR (Svejstrup, 2002) (figure 15). Ce mécanisme est conservé de la bactérie à l'homme. Chez la bactérie, le produit du gène *MDF* (TRCF pour *transcription repair coupling factor*) reconnaît l'ARNP II arrêtée au niveau d'une lésion, la déplace et recrute la machinerie de réparation (Selby et Sancar, 1993). Chez les eucaryotes, ce mécanisme reste mal connu mais les protéines CSA et CSB pourraient jouer le rôle de TRCF. Ce mécanisme n'est pas restreint à la NER. En effet, des lésions réparées par BER (telles que les thymines glycol ou les 8-oxo-guanines) se trouvant sur le brin transcrit de l'ADN sont également réparées par TCR, montrant ainsi le caractère polyvalent de ce mécanisme (Le Page *et al.*, 2000 ; Pastoriza Gallego et Sarasin, 2003). Je décrirai préférentiellement la TCR couplée à la NER dans la suite de ce paragraphe.

La TCR nécessite tous les facteurs cités précédemment excepté XPC-hHR23B impliqué dans la reconnaissance de la lésion.

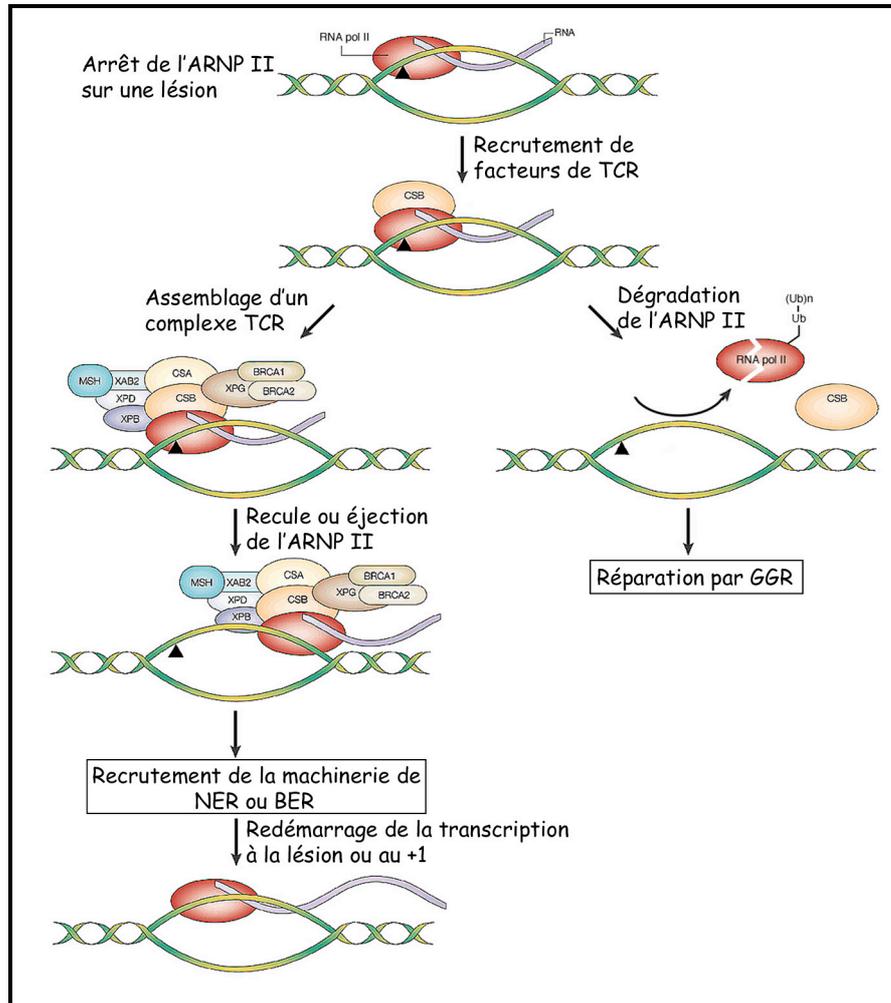


Figure 15 □ : Modèle de réparation couplée à la transcription.

En plus de ces facteurs généraux de la réparation, la TCR nécessite une ARNP II transcriptionnellement active qui détecte la lésion ainsi que des facteurs spécifiques que sont CSA et CSB (Christians et Hanawalt, 1992 ; Henning *et al.*, 1995). Des mutations dans ces protéines sont à l'origine du syndrome de Cockayne (CS) (voir section II.4). Le rôle de CSB reste le mieux compris. C'est un membre de la famille des facteurs remodelant la chromatine SWI/SNF capable de stimuler la transcription de l'ARNP II *in vitro* et *in vivo* (Citterio *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2001 ; Selby et Sancar, 1997a). Le mécanisme de la TCR reste à être élucidé chez les eucaryotes. Un modèle propose que l'ARNP II arrêtée par une lésion signale le dommage et permette le recrutement de facteurs de TCR tels que CSA et CSB (van Gool *et al.*, 1997). Bien que la composition du complexe de TCR ne soit pas connue, plusieurs scénarios sont proposés pour les étapes suivantes. Généralement il est admis que l'ARNP II se retrouve, soit

éjectée de l'ADN, soit déplacée de la lésion pour permettre l'accès aux protéines de la NER ou de la BER (figures 15 et 16).

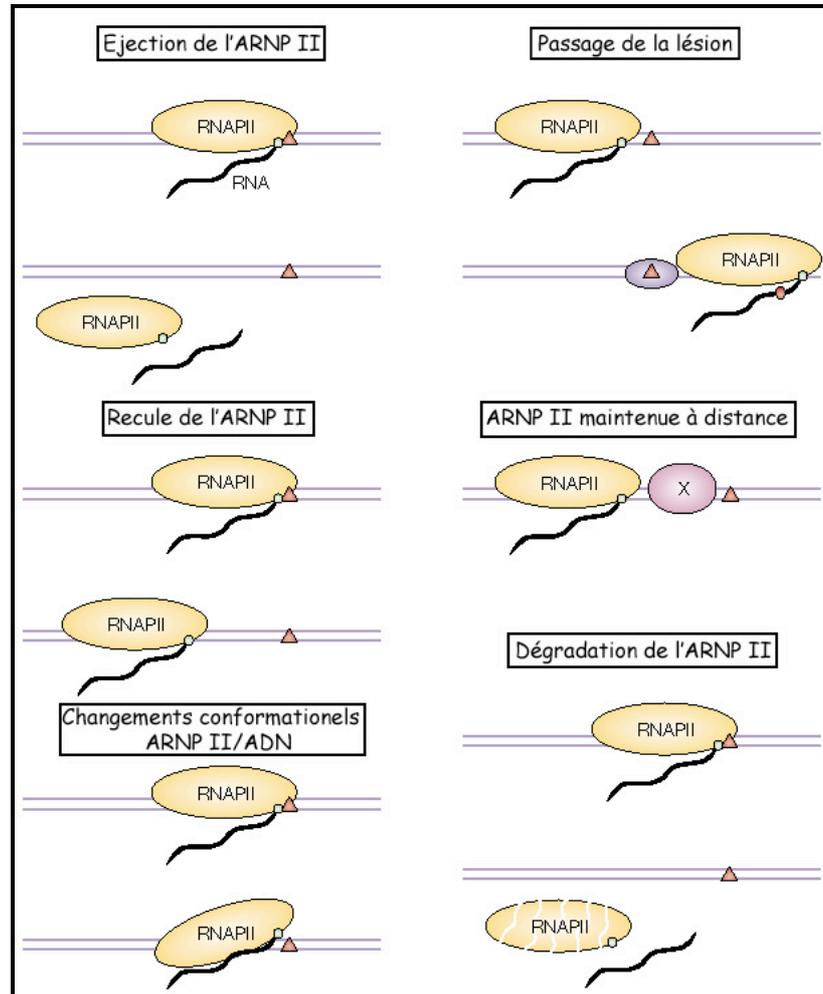


Figure 16 : Différents modèles de déplacement de l'ARNP II durant la TCR.

Il a été initialement proposé que CSB fonctionne comme le facteur TRCF procaryote en dissociant l'ARNP II de la lésion grâce à son activité ATPase (Selby et Sancar, 1993) (figure 16). Il a été démontré plus tard que CSB seul ou avec CSA ne peut dissocier une ARNP II arrêtée par une lésion *in vitro* (Selby et Sancar, 1997b). CSB pourrait utiliser son activité ATPase pour altérer la structure ARNP II/ADN et ainsi dégager la lésion. Le déplacement de l'ARNP II pourrait également être effectué par des facteurs tels que HuF2 capable de déplacer aussi bien l'ARNP I et II arrêtées par une lésion sur l'ADN *in vitro* (Hara *et al.*, 1999). TFIIS pourrait également permettre à l'ARNP II de reculer lorsqu'elle se retrouve bloquée par une lésion (Donahue *et al.*, 1994). Néanmoins, la participation de ces facteurs (HuF2 et TFIIS) dans le mécanisme de TCR reste questionnable.

Un autre moyen plus drastique pour déplacer l'ARNP II serait sa dégradation. En effet, après irradiation aux UV, l'ARNP II devient ubiquitinylée sur sa plus grande sous-unité (Bregman *et al.*, 1996). Cette ubiquitinylation provoque la dégradation rapide de l'enzyme par le protéasome (Ratner *et al.*, 1998). L'ubiquitinylation et la dégradation ne s'opèrent pas correctement dans les cellules CSA et CSB, ce qui suggère que la TCR nécessite l'éjection et la dégradation de l'ARNP II pour permettre à la machinerie de NER d'accéder à la lésion (McKay *et al.*, 2001). Néanmoins, de récentes études montrent que la dégradation de l'ARNP II serait une alternative à la TCR plutôt qu'une nécessité (Woudstra *et al.*, 2002). Dans ce modèle l'ARNP II serait soit déplacée, pour permettre la réparation rapide de la lésion et la continuation de la transcription, soit dégradée pour que la lésion soit réparée par GGR (Svejstrup, 2002 ; Svejstrup, 2003).

Outre le mécanisme de TCR, une autre question reste irrésolue : pourquoi les lésions sont-elles réparées plus vite par TCR que par GGR ? *In vivo* la structure de la chromatine pourrait être un obstacle à la réparation rapide des lésions par GGR (Wang *et al.*, 1991). Le remodelage de la chromatine durant la transcription (grâce à l'activité ATPase de CSB et/ou le déplacement de l'ARNP II) pourrait donc expliquer la réparation préférentielle des lésions se trouvant sur le brin transcrit de l'ADN, puisque les nucléosomes présents sur ce brin ne semblent pas influencer la TCR (Tijsterman *et al.*, 1999). De plus, un taux de réparation plus élevé a aussi été observé dans les régions proches des promoteurs actifs *in vivo* et *in vitro* et de façon indépendante de CSB et du brin d'ADN étudié (Frit *et al.*, 2002 ; Tu *et al.*, 1996). Le recrutement de différents FRC près du promoteur pourrait expliquer ce phénomène.

Enfin, il faut noter que la transcription est inhibée en réponse aux dommages sur l'ADN. Différents mécanismes pourraient expliquer cette inhibition. Après irradiation aux UV, la forme hypophosphorylée du CTD de l'ARNP II (ARNP IIA) disparaît dans la cellule (Rockx *et al.*, 2000). Alors que dans les cellules sauvages, l'ARNP IIA, nécessaire à l'initiation de la transcription, réapparaît après quelques heures, dans les cellules CSB, seule la forme hyperphosphorylée (ARNP IIO), incapable d'initier la transcription, persiste. Ceci montre l'importance de CSB dans le mécanisme d'inhibition de la transcription en réponse aux dommages sur l'ADN. L'affinité de la TBP, pour les lésions réparées par NER, pourrait aussi être impliquée dans ce phénomène d'inhibition de la transcription (Vichi *et al.*, 1997).

3. La NER dans un contexte chromatinien

L'assemblage de l'ADN en chromatine affecte autant l'apparition des dommages sur l'ADN que la réparation des lésions se trouvant dans de telles structures. Le réarrangement de la chromatine apparaît donc comme une nécessité pour permettre le recrutement de la machinerie de réparation, particulièrement dans les régions non actives du génome (Thoma, 1999 ; Ura et Hayes, 2002). En effet, le réarrangement de la chromatine durant la transcription pourrait permettre l'accès des lésions à la machinerie de réparation dans les régions actives du génome.

La distribution, plus que l'étendue, des dommages dus aux rayonnements UV dépend, en plus de la séquence nucléotidique, de l'arrangement de l'ADN en nucléosomes. En effet, l'analyse des nucléosomes isolés de cellules irradiées aux UV montre une périodicité de 10,3 paires de bases dans la distribution des lésions CPD, avec une forte préférence pour les régions de l'ADN orientées en dehors de la surface des histones (Gale *et al.*, 1987). Les lésions 6-4PP, d'un autre côté, montrent une distribution plus uniforme, avec malgré tout une préférence pour les régions internucléosomales (Mitchell *et al.*, 1990). Il faut noter que la distorsion de l'ADN provoquée par ces lésions, n'engendre pas de dissolution, ni de changements conformationnels de la structure nucléosomale (Liu *et al.*, 2000b). Néanmoins, l'irradiation aux UV d'un ADN nu réduit l'efficacité de formation du nucléosome *in vitro* (Liu *et al.*, 2000b).

La présence de nucléosomes sur l'ADN endommagé inhibe de façon drastique l'activité de réparation de la machinerie de NER (Wang *et al.*, 1991). De plus, l'activité de double incision des facteurs de la NER hautement purifiés, est fortement réduite sur une matrice d'ADN contenant un dinucléosome et une lésion à un endroit précis. Cette inhibition est observée même si la lésion se trouve dans la région internucléosomale (Ura *et al.*, 2001). Ces résultats montrent que, *in vivo*, d'autres facteurs autre que les 6 facteurs de la double incision, sont nécessaires pour passer outre l'inhibition de la NER due à la chromatine. L'inhibition des HDAC permet une augmentation du taux de NER d'environ 2 fois (Ramanathan et Smerdon, 1989). Il faut aussi noter que PCNA interagit avec l'HAT p300 et pourrait donc la recruter sur la chromatine endommagée (Hasan *et al.*, 2001). Enfin, le complexe TFIIIC, contenant une activité HAT, possède également une activité de liaison à l'ADN endommagé, reflétant, une fois de plus, le rôle de l'acétylation des histones dans l'accès des facteurs de NER sur la lésion (Brand *et al.*, 2001). Néanmoins, il semblerait que les FRC aient un rôle prépondérant dans la NER des nucléosomes *in vivo*. En effet, le FRC ACF facilite l'excision de lésions 6-4PP *in vitro*, situées sur une matrice chromatinienne (Ura *et al.*,

2001). De même, le complexe SWI/SNF augmente l'incision d'un adduit N-AAF situé sur un nucléosome l'activité de remodelage de la chromatine de SWI/SNF est activée par XPA, XPC et RPA (Hara et Sancar, 2002). Enfin, il faut rappeler que le facteur de TCR CSB possède également une activité de remodelage de la chromatine (Citterio *et al.*, 2000). Un modèle peut donc se dégager de ces résultats dans lequel les protéines de reconnaissance de la lésion permettraient le recrutement de FRC (et/ou d'HAT), qui à leur tour, permettrait l'accès de la machinerie de NER sur le dommage chromatinien (figure 17).

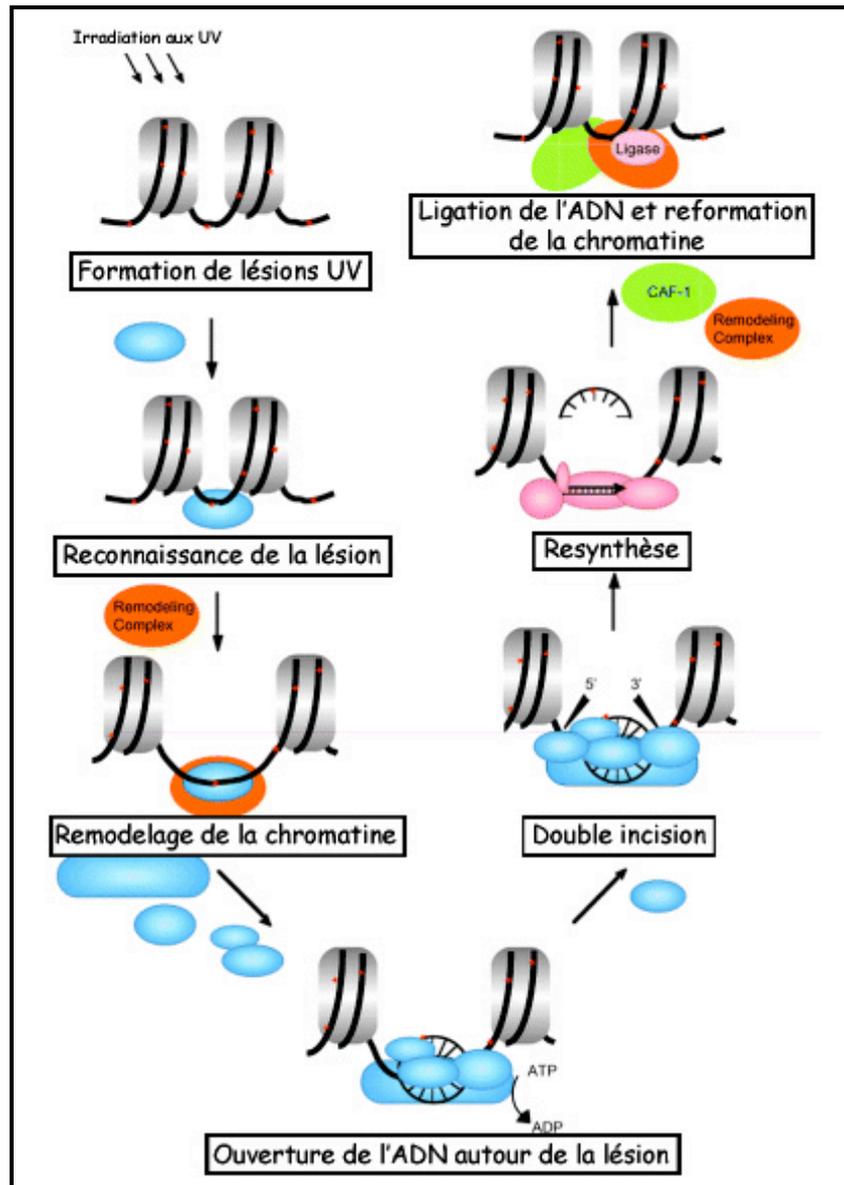


Figure 17 : Modèle de NER dans un contexte chromatinien.

4. Les syndromes liés à la NER

Des mutations dans l'une des protéines de la NER peuvent être à l'origine de maladies génétiques rares récessives que sont le *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD). Des études de fusions de cellules ont permis d'identifier 7 groupes de complémentation chez les patients XP (XP-A à XP-G), 2 groupes chez les patients CS (CS-A et CS-B), 3 groupes chez les patients XP/CS (XP-B, XP-D et XP-G) et 3 groupes chez les patients TTD (XP-B, XP-D et TTD-A). Chacun de ces groupes reflète un défaut dans le gène correspondant (tableau 5).

Groupes de complémentation	Fréquence relative	Réparation (NER)			Clinique			Syndromes associés
		GGR	TCR	UDS	Sensibilité aux UV	Cancers cutanés	Anomalies neurologiques	
XP-A	élevée	-	-	< 5%	+++	+	++ ^a	XP
XP-B	très rare	-	-	10-40%	++	+/-	++/+ ^b	XP/CS, TTD
XP-C	élevée	-	+	15-30%	+	+	-	XP
XP-D	intermédiaire	-	-	15-30%	++	+/-	++/± ^b	XP, XP/CS, TTD
XP-E	rare	-	?	≥ 50%	±	+/-	-	XP
XP-F	rare	-	-	15-30%	+	+/-	-/± ^a	XP
XP-G	rare	-	-	2-25%	++	+/-	++/+ ^b	XP, XP/CS
CS-A	intermédiaire	+	-	100%	+	-	++ ^b	CS
CS-B	élevée	+	-	100%	+	-	++ ^b	CS
TTD-A	très rare	-	-	10%	+	-	+ ^b	TTD

GGR : réparation globale du génome ; TCR : réparation couplée à la transcription ; a : neurodégénérescence b : démyélinisation ; UDS : Unscheduled DNA synthesis (synthèse d'ADN non programmée)

Tableau 5 : Les différents groupes de complémentation des syndromes XP, CS et TTD.

Le spectre des caractéristiques cliniques varie énormément entre ces 3 différents syndromes et plusieurs anomalies ne peuvent seulement s'expliquer par un défaut de NER (tableau 6).

4.1 Le *Xeroderma pigmentosum*

L'incidence de cette maladie varie entre 1 pour 250.000 aux Etats-Unis et en Europe, à 1 pour 40.000 au Japon. L'espérance moyenne de vie des individus XP est de 40 ans, soit une réduction d'environ 30 ans par rapport à la population générale (Kraemer *et al.*, 1987). Ces patients ont une sensibilité extrême aux rayons UV qui résulte en une dégénérescence progressive des régions du corps exposées au soleil. Ainsi, leur peau présente un aspect

parcheminé (*Xeroderma*) avec une pigmentation anormale (*pigmentosum*) (de Boer et Hoeijmakers, 2000 ; Lehmann, 2003). Ces symptômes cutanés apparaissent généralement dès l'âge de 1 à 2 ans, lors des premières expositions au soleil. Les patients développent des cancers de la peau d'une fréquence de 1000 à 4000 fois supérieure à celle de la population générale. Ces cancers sont principalement des carcinomes des cellules basales et squameuses et plus rarement des mélanomes. L'âge moyen d'apparition est de 8 ans, soit environ 50 ans plus tôt que pour la population générale. Une augmentation de la fréquence de cancers internes, tels que les leucémies, tumeurs du cerveau, carcinomes gastriques et cancers du poumon, a également été rapportée (augmentation de 10 à 20 fois pour les patients de moins de 20 ans). Différentes complications oculaires (paupière, conjonctive et cornée) sont dénombrées. Elles incluent une opacité de la cornée pouvant conduire à la cécité.

Symptômes	Syndromes			
	XP	XP/CS	CS	TTD
Cutanés				
photosensibilité	++	++	+	+/-
anomalies pigmentaires	++	+	-	-
cheveux et ongles cassants	-	-	-	+
ichtyose	-	-	-	+
cancer de la peau	++	+	-	-
Développementaux				
retard de croissance	-	+	+	+
immaturité sexuelle	-	+	+	+
Neurologiques				
neurodégénérescence	+	+	+	-
neurodémýélinisation	-	+	+	+
dégénération mentale	+/-	+	+	+
ataxie	+/-	+	+	+/-
microcéphalie	+/-	+	+	+/-
Cellulaires				
UDS (% contrôle)	5-50	5-50	normale	5-50
sensibilité aux UV	++	++	+	+/-

Tableau 6: Symptômes associés aux syndromes XP, CS et TTD.

De plus, approximativement 20% des patients XP présentent des troubles neurologiques résultant d'une dégénérescence progressive des neurones du système nerveux central et

périphérique. Les patients les plus sévèrement affectés souffrent d'une détérioration de l'audition, d'une perte progressive des réflexes tendineux, de retards mentaux, de microcéphalies, de nanisme et d'hypogonadisme. Bien que l'âge de déclenchement de ces symptômes varie considérablement, les enfants développant des troubles neurologiques avant l'âge de 7 ans présentent d'importants retards de croissance (Rapin *et al.*, 2000). Ces patients sont regroupés au sein du syndrome de DeSanctis-Cacchione.

Il semblerait que les patients ayant un faible défaut de NER, tel que les patients XP-C et XP-F, ne développent pas ou peu de symptômes neurologiques, comparé aux patients souffrant d'un plus grave défaut de NER tel que les patients XP-A (de Boer et Hoeijmakers, 2000). Un défaut de NER dans les neurones, pourrait expliquer ces symptômes (Reardon *et al.*, 1997).

Le syndrome XP est caractérisé par une hétérogénéité génétique. Les patients XP-A, XP-B, XP-D et XP-G présentent de graves défauts de NER et donc, ont des symptômes plus sévères que les autres patients XP. Néanmoins, une faible activité de NER est détectée dans les 2 derniers groupes (l'activité de NER est mesurée dans les cellules par incorporation de thymidine tritiée lors de l'étape de resynthèse du fragment d'ADN lésé (UDS pour *unscheduled DNA synthesis*)). De plus, la majorité des malades appartiennent aux groupes XP-A, XP-V (principalement retrouvés au Japon) et XP-C, XP-D (principalement retrouvés en Europe) (Robbins *et al.*, 1974). Le groupe de patients XP-V reste à part dans le sens où la protéine XPV n'est pas impliquée dans le processus de NER, mais est une ADN polymérase permettant le passage de la lésion durant la réplication (Johnson *et al.*, 1999 ; Washington *et al.*, 2001). Les patients XP-V représentent 20% des malades XP.

Des mutations dans la protéine XPD, associée au facteur de transcription/réparation TFIIH (voir chapitre III), peuvent aussi bien affecter la NER que la transcription reflétant ainsi l'hétérogénéité des symptômes associés à ces mutations. En effet, de telles mutations peuvent conduire aux phénotypes associés aux syndromes XP, XP/CS et TTD. Le phénotype XP pourrait être expliqué par un défaut de NER seul, alors que le phénotype TTD pourrait résulter d'un défaut de NER et de transcription (Dubaele *et al.*, 2003).

XPC est seulement requise pour la GGR et non pour la TCR, en conséquence, les patients XP-C sont moins sensibles aux UV que les patients XP-D et ils ne souffrent pas de problèmes neurologiques (Lehmann, 2003). Les souris 'knock-out' pour ce gène, bien que développant des cancers de la peau, ne sont pas plus photosensibles que les souris sauvages (Sands *et al.*, 1995).

4.2 Le syndrome de Cockayne

Les caractéristiques cliniques des patients CS ont peu en commun avec celles des patients XP (tableau 6). Les symptômes vont d'une photosensibilité cutanée accrue aux rayons UV à des retards physiques et mentaux importants. La photosensibilité ne se caractérise pas par une pigmentation anormale de la peau, ni par une prédisposition accrue aux cancers cutanés. La démyélinisation des nerfs du système nerveux central et périphérique est, en partie, à l'origine de dysfonctionnements neurologiques (microcéphalie, retards mentaux, neurodégénérescence). Certains troubles, notamment oculaires (rétinopathie, atrophie du disque optique, cataracte) et auditifs (surdité), rappellent les caractéristiques du vieillissement de la population générale. Les patients CS présentent des anomalies du squelette et des signes d'ostéoporose normalement rencontrés chez les personnes âgées. L'espérance de vie moyenne est de 12 ans et les causes majeures de décès sont les pneumonies et autres infections respiratoires (de Boer et Hoeijmakers, 2000). La plupart de ces symptômes sont difficiles à expliquer par un défaut de TCR seul, étant donné que les patients XP-A, n'ayant plus d'activité de NER, ne possèdent pas ces symptômes.

Des mutations dans l'une des protéines CS (CSA et CSB) sont à l'origine de ces symptômes. La majorité des patients appartient au groupe CS-B. Il faut noter qu'il n'existe pas de lien clair entre la mutation et le phénotype observé, suggérant que les caractéristiques cliniques de cette maladie peuvent être influencées par le fond génétique. En effet, une même mutation dans CSB a été retrouvée chez des patients ayant des symptômes différents (Colella *et al.*, 2000).

Les cellules CS manifestent un défaut de réparation préférentielle des lésions localisées sur le brin transcrit de l'ADN et sont hypersensibles aux rayons UV (Venema *et al.*, 1990). L'exposition des cellules aux UV inhibe la synthèse générale d'ARN et cette inhibition de la transcription persiste, alors qu'elle est progressivement levée 16 à 24 h post-irradiation dans les cellules normales ou XP. L'implication des protéines CS dans la réparation des lésions oxydatives par TCR pourrait en partie expliquer les troubles neurologiques des patients CS déficients pour cette voie de réparation (Cooper *et al.*, 1997 ; Le Page *et al.*, 2000). En effet, ce défaut de réparation a été retrouvé dans les cellules de patients XP-G présentant un phénotype XP/CS, mais pas dans les cellules de patients XP-G présentant un phénotype XP seul (Cooper *et al.*, 1997).

Contrairement aux patients CS, les souris 'knock-out' pour CSB présentent une augmentation de la tumorigenèse induite par les UV et par certains carcinogènes chimiques. Celle-ci pourrait être liée à l'absence, chez les rongeurs, de réparation des lésions CPD par GGR. Lorsque la TCR est défaillante, il n'existe plus aucune voie de réparation éliminant ces dommages (van der Horst *et al.*, 1997).

Enfin, le rôle de CSB dans la transcription des gènes de classe I et II suggère que le défaut de transcription chez les patients CS pourrait contribuer aux phénotypes observés (Bradsher *et al.*, 2002 ; Selby et Sancar, 1997a).

4.3 La trichothiodystrophie

La trichothiodystrophie (TTD) est une maladie génétique récessive rare caractérisée par des symptômes tels que les cheveux et les ongles cassants – les patients souffrent également de retards développementaux et mentaux comparables aux patients CS et dus à un défaut de myélinisation des neurones du système nerveux (Bergmann et Egly, 2001). Un défaut de différenciation des kératinocytes serait à l'origine de la diminution de l'expression des protéines structurales des cheveux et des phanères des individus TTD. Le recouvrement des symptômes avec les patients CS, comme le retard de croissance, reste très hétérogène chez les patients TTD et peut aller du léger retard à l'affaiblissement extrême causant la mort des jeunes enfants. Plusieurs syndromes ont été décrits comme faisant partie de la TTD – je ne parlerai par la suite que des patients TTD photosensibles (de type PIBIDS) (de Boer et Hoeijmakers, 2000). Les patients TTD photosensibles peuvent être regroupés en 3 groupes génétiques présentant des défauts de NER – XP-B, XP-D et TTD-A. La majorité des patients TTD appartiennent au groupe XP-D (95%) et le gène codant pour TTD-A n'a pas encore été identifié. Aucun cancer de la peau n'a été reporté chez les TTD et la pigmentation de celle-ci présente de légères anomalies en comparaison aux patients XP. Le défaut de réparation des lésions UV des cellules TTD peut être réverté par microinjection de TFIIH purifié (Vermeulen *et al.*, 2000). Il a été récemment démontré que les caractéristiques cliniques des patients TTD dues à des mutations dans XPD, seraient provoquées par une diminution de l'activité de transcription de TFIIH (Dubaele *et al.*, 2003). Une destabilisation et un taux réduit du complexe TFIIH dans les cellules TTD pourraient aussi expliquer les phénotypes observés chez ces patients (Botta *et al.*, 2002). Le rôle de TFIIH dans l'activation de la transcription et dans

la transcription des gènes de classe I pourrait aussi être responsable des phénotypes observés chez les TTD (Iben *et al.*, 2002 ; Keriel *et al.*, 2002).

Un modèle murin de la maladie reproduit la plupart des caractéristiques cliniques des patients TTD, ainsi que le vieillissement prématuré probablement lié à l'accumulation de mutations et à l'inhibition de la transcription qui en résulte. A l'inverse des patients, ces souris développent des cancers cutanés après irradiation aux UV (de Boer *et al.*, 2002 ; de Boer *et al.*, 1998). L'origine de cette dissemblance est probablement identique à ce qui a été décrit pour les souris *CSB*^{-/-} (réparation des CPD plus efficace chez l'homme).

Pour conclure, il est important de rappeler que la différence de phénotypes entre les patients XP et les patients CS et TTD, malgré un taux de NER sensiblement identique, pourrait être due à un défaut de transcription chez ces derniers. En effet, les protéines *CSB*, *XPB*, *XPD* et *XPG*, responsables des phénotypes XP/CS et TTD (pour *XPB* et *XPD*) sont impliquées dans la transcription des gènes de classe I et/ou de classe II (Bradsher *et al.*, 2002 ; Clarkson, 2003 ; Gerard *et al.*, 1991 ; Iben *et al.*, 2002 ; Selby et Sancar, 1997a). Il semble donc que le syndrome XP résulte d'un défaut de NER, alors qu'une défaillance de la transcription pourrait expliquer les symptômes spécifiques des syndromes CS et TTD (retard de croissance et de développement, retards mentaux, cheveux et ongles cassants par exemple).

CHAPITRE III : TFIIH: UN FACTEUR MULTIFONCTIONNEL

TFIIH est un complexe multiprotéique originalement identifié comme étant l'un des 6 facteurs généraux nécessaires à la transcription des gènes de classe II chez les eucaryotes. Il fut purifié il y a plus de 10 ans chez le rat (facteur α), la levure (facteur b) et chez l'homme (BTF2) (Conaway et Conaway, 1989 ; Feaver *et al.*, 1991 ; Gerard *et al.*, 1991). Il est hautement conservé parmi ces espèces. C'est le plus gros et le plus complexe des facteurs généraux de la transcription. Il est composé de 9 sous-unités d'un poids moléculaire allant de 32 à 89 kDa et il possède 3 activités enzymatiques intrinsèques : 2 activités ADN hélicases dépendantes de l'ATP de polarités opposées (XPB et XPD) et une activité kinase (cdk7) (Coin et Egly, 1998) (figure 18). Avec le clonage systématique de ses sous-unités, il a été surprenant de découvrir que 2 de ses sous-unités (XPB et XPD) étaient déjà connues pour être impliquées dans la NER (Schaeffer *et al.*, 1994 ; Schaeffer *et al.*, 1993 ; Weber *et al.*, 1990 ; Weeda *et al.*, 1990). En plus de son rôle dans la NER, TFIIH est aussi impliqué dans la transcription des gènes de classe I et dans le cycle cellulaire de par son activité kinase, portée par cdk7, capable d'activer d'autres cdk (Iben *et al.*, 2002 ; Roy *et al.*, 1994). De plus, TFIIH pourrait aussi être impliqué dans l'apoptose de par son interaction avec p53 (Xiao *et al.*, 1994).

1. Les sous-unités de TFIIH

Après purification par chromatographie ou immunoprécipitation à haute concentration saline, les 9 sous-unités de TFIIH se retrouvent soit associées pour former TFIIH, soit sous forme de divers sous complexes : le cœur de TFIIH composé de XPB, p62, p52, p44 et p34 et le sous complexe CAK composé de cdk7, MAT1 et cycline H. L'hélicase XPD peut s'associer soit au CAK soit au cœur de TFIIH, montrant ainsi un rôle dans le pontage entre les 2 sous complexes (Drapkin *et al.*, 1996 ; Reardon *et al.*, 1996 ; Rossignol *et al.*, 1997) (figure 18).

contient une séquence de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear localization sequence*) et un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice nécessaire à son activité (Ma *et al.*, 1994a). XPB est nécessaire à l'activité de transcription et de réparation de TFIIH (Evans *et al.*, 1997 ; Tirode *et al.*, 1999).

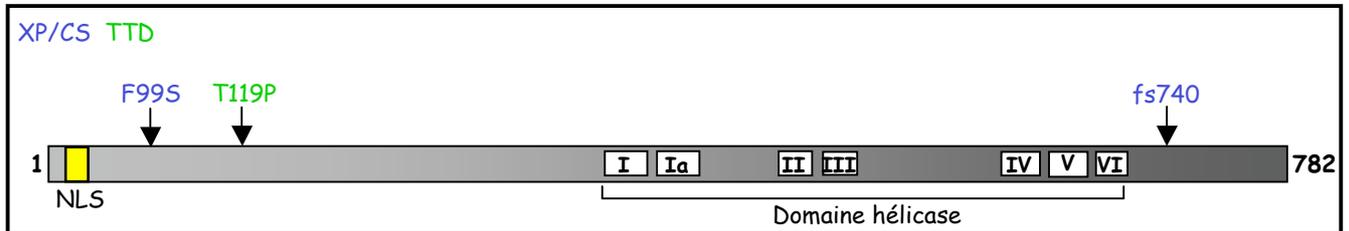


Figure 19 □ : Mutations et domaines de la protéine XPB (fs = décalage du cadre de lecture).

XPB possède des homologues chez un grand nombre d'organismes eucaryotiques supérieurs. Trois mutations dans le gène *XPB* ont été identifiées chez 6 patients atteints de TTD ou de XP/CS (Cleaver *et al.*, 1999) (figure 19). Le rôle fondamental de XPB dans l'étape de l'initiation de la transcription pourrait expliquer le peu de patients portant une mutation dans ce gène.

XPB, est un polypeptide de 760 acides aminés ayant un poids moléculaire de 80 kDa. Comme XPB, *XPB* fait partie des hélicases de la superfamille SF2 (Eisen *et al.*, 1995). Cette protéine, composée de 7 motifs hélicases, possède une activité ADN hélicase de polarité 5'-3' dépendante de l'ATP (Sung *et al.*, 1993) (figure 20). *XPB* comprend aussi 7 motifs correspondant à un domaine ARN hélicase, mais aucune activité ARN hélicase n'a pu être démontrée. Cependant, l'homologue de *XPB* de levure, *RAD3*, possède une activité ARN hélicase et son ADN hélicase est nécessaire à l'activité de réparation de la protéine (Deschavanne et Harosh, 1993 ; Sung *et al.*, 1996).

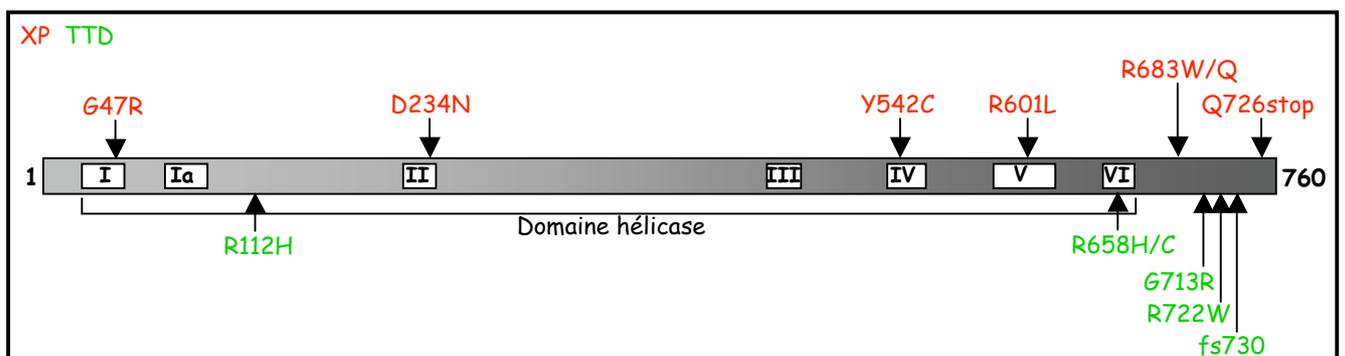


Figure 20 □ : Mutations causales et domaine de la protéine XPB.
(D'après (Taylor *et al.*, 1997)).

L'activité hélicase de XPD peut être modulée par son association à la sous-unité p44. En effet, notre laboratoire a montré que son activité est multipliée par 10 lorsque XPD est associée à TFIIH via p44. Un manque d'interaction entre ces protéines pourrait expliquer certains phénotypes XP observés (Coin *et al.*, 1998). L'activité de XPD semble moins cruciale que celle de XPB dans la réaction de transcription (Moreland *et al.*, 1999). En effet, des mutations dans XPD inhibent l'activité de réparation, mais pas de transcription de TFIIH ; ceci pourrait expliquer, en partie, le nombre plus important de patients portant des mutations dans XPD que dans XPB (Tirode *et al.*, 1999 ; Winkler *et al.*, 2000). La présence plus que l'activité de XPD serait importante en transcription (Bradsher *et al.*, 2000) (**publication 2**). L'ancrage du CAK au cœur de TFIIH semble être une fonction importante de XPD (**publication 2**). Cette importance relative de XPD en transcription a aussi été montrée chez la levure, où une mutation dans le site ATPasique de RAD3 n'affecte pas la viabilité de la cellule (Sung *et al.*, 1988).

La majorité des patients XPD sont hétérozygotes composites, ce qui complique l'établissement d'une relation génotype-phénotype. Taylor *et al.* ont montré que certaines mutations sont spécifiques d'une maladie (Taylor *et al.*, 1997) (figure 20). Il faut aussi noter que des patients de phénotypes XP/CS portent des mutations dans cette sous-unité de TFIIH.

p62, est un polypeptide de 548 acides aminés ayant un poids moléculaire de 62 kDa. Ce fut la première sous-unité humaine de TFIIH à être clonée (Fischer *et al.*, 1992). Cette sous-unité est nécessaire à l'activité de transcription de TFIIH (Tirode *et al.*, 1999). De plus, une mutation chez son homologue de levure (TFB1) confère à la cellule une hypersensibilité aux rayons UV (Matsui *et al.*, 1995). p62 interagit directement avec plusieurs régulateurs de la transcription ciblant TFIIH (Blau *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 2001a). L'ADN génomique humain de p62 comprend 14 exons recouvrant 21 kpb (Perez *et al.*, 1998).

p52, est un polypeptide de 436 acides aminés ayant un poids moléculaire de 52 kDa. Elle fut la dernière sous-unité de TFIIH à avoir été clonée (Marinoni *et al.*, 1997). Elle est essentielle à l'activité de réparation et de transcription de TFIIH (Jawhari *et al.*, 2002 ; Marinoni *et al.*, 1997 ; Tirode *et al.*, 1999). La délétion de la région carboxy-terminale de TFB2, son homologue de levure, inhibe la réparation de l'ADN *in vivo* et *in vitro* (Feaver *et al.*, 1997). Le gène humain de p52 comprend 14 exons et couvre 7 kpb (Marinoni *et al.*, 1997). Enfin, p52 est impliquée dans l'ancrage de XPB au sein du complexe TFIIH, elle jouerait donc un rôle structural (Jawhari *et al.*, 2002).

p44, est une protéine de 44 kDa composée de 395 acides aminés. p44 possède dans sa partie carboxy-terminale 2 motifs structuraux liant le zinc □ un motif de type 'doigt de zinc' et un motif de type 'ring finger-like' (Humbert *et al.*, 1994) (figure 21).

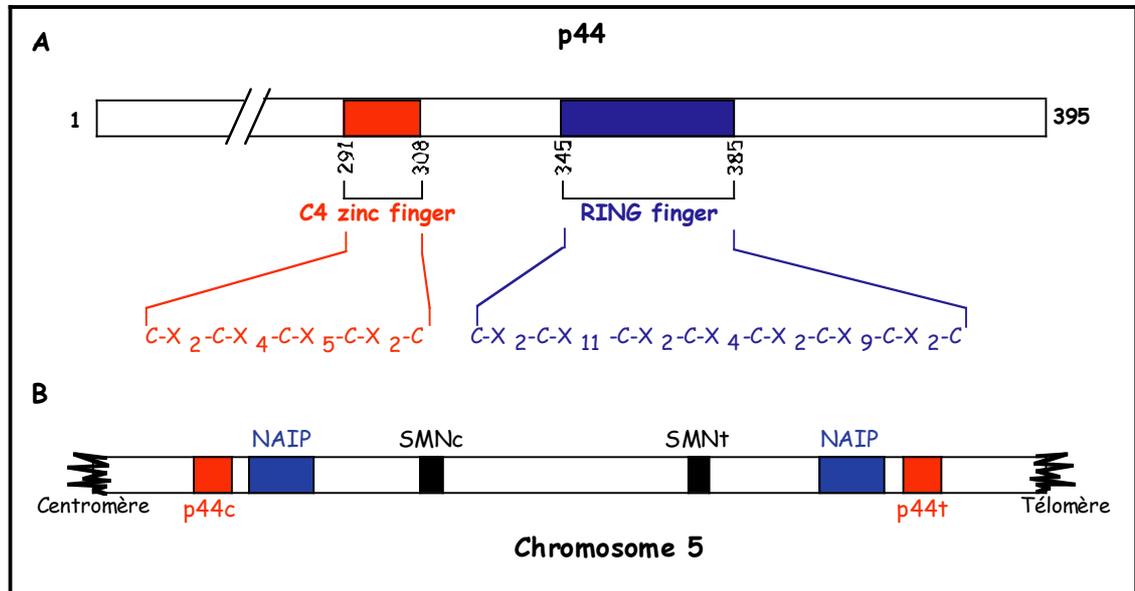


Figure 21 □ Motifs structuraux et organisation chromosomique de p44.

Le motif en 'doigt de zinc' est responsable de l'intégration de p62 dans le complexe TFIIH. De plus, le 'ring finger' est indispensable à l'activité d'échappée du promoteur de TFIIH. En effet, des mutations dans les résidus très conservés de ces 2 motifs, responsables de la chélation des atomes de zinc, empêchent l'intégration de p62 au sein de TFIIH et l'échappée du promoteur (**publication 3**). La partie amino-terminale de p44 interagit avec XPD et stimule son activité hélicase d'au moins 10 fois (Coin *et al.*, 1998 ; Seroz *et al.*, 2000). Elle interagirait aussi avec p34.

Il existe 2 copies de p44 dans le génome humain (figure 21). En effet, une région génomique comprenant p44, mais également les gènes SMN et NAIP, est dupliquée chez l'homme. Une copie de p44 se retrouve du côté centromérique du chromosome 5 (p44c) et une autre copie du côté télomérique de ce même chromosome (p44t) (Burglen *et al.*, 1997). La région télomérique est délétée chez certains patients atteints de la maladie de Werdnig-Hoffman, conduisant à une atrophie musculaire spinale. Bien que cette délétion puisse éliminer une partie de la séquence de p44t, il ne semble pas que p44 soit impliqué dans cette maladie, puisque la copie centromérique reste intacte et fonctionnelle. De plus, les activités de base de TFIIH restent inchangées suivant que p44c ou p44c/t soient intégrés à TFIIH (Burglen *et al.*, 1997 ; Tirode *et al.*, 1999) (**publication 2**). Ces 2 copies de p44 ne diffèrent que par 3 acides aminés.

L'homologue de p44 de levure (SSL1 pour *suppressor of stem loop 1*) a été identifié lors d'un criblage génétique pour la recherche de protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. En effet, SSL1 stimule la traduction d'un ARN possédant une structure en épingle à cheveux en début de séquence (Yoon *et al.*, 1992). Les levures possédant une mutation dans ce gène montrent un défaut de transcription, ainsi qu'une hypersensibilité aux rayons UV liée à un défaut de réparation de l'ADN (Wang *et al.*, 1995 ; Yoon *et al.*, 1992). Enfin, l'interaction entre SSL1 et TFB1 est indispensable à la viabilité de la levure (Matsui *et al.*, 1995). Ceci expliquerait le défaut d'intégration de p62 dans des TFIIH mutés dans p44 (**publication 3**).

p34, est un polypeptide de 303 acides aminés ayant un poids moléculaire de 34 kDa (Humbert *et al.*, 1994). Bien que cette protéine possède un motif en 'doigt de zinc' identique à celui de p44, aucune activité de liaison à l'ADN n'a été caractérisée à ce jour. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que p34 est fortement associé à p44 et pourrait avoir un rôle structural en maintenant la cohésion de TFIIH. Son homologue de levure, TFB4, est essentiel à l'activité de transcription et de réparation de TFIIH (Feaver *et al.*, 1999).

1.2 Le sous complexe CAK

Ce complexe est composé de 3 sous-unités (cdk7, cycline H et MAT1) et peut exister sous forme libre dans la cellule ou associée soit à XPD soit au cœur TFIIH/XPD pour former TFIIH (Drapkin *et al.*, 1996 ; Reardon *et al.*, 1996). La spécificité de substrat de CAK diffère suivant qu'il soit associé à TFIIH ou non (Rossignol *et al.*, 1997 ; Yankulov et Bentley, 1997). En effet, associé à TFIIH, CAK phosphoryle préférentiellement le CTD de l'ARNP II et certains facteurs de transcription tel que TBP, TFIIE, TFIIF et RAR (Bastien *et al.*, 2000 ; Rossignol *et al.*, 1997 ; Roy *et al.*, 1994 ; Yankulov et Bentley, 1997). Sous forme libre CAK phosphoryle préférentiellement les cdk impliquées dans le cycle cellulaire tel que cdk1, 2, 4 et 6 (Nigg, 1996).

Cdk7, est une protéine de 346 acides aminés ayant un poids moléculaire de 40 kDa. Initialement clonée chez le xénope et nommée MO15, cette protéine fut renommée cdk7 après l'identification de son partenaire la cycline H (Makela *et al.*, 1994 ; Shuttleworth *et al.*, 1990). Cdk7 possède, comme la plupart des kinases, un domaine de liaison à l'ATP de type GXGKT, une boucle T contenant les résidus phosphorylables, une séquence PSTAIRE permettant son

interaction avec la cycline H et un site catalytique (Nigg, 1996). Cdk7 se distingue des autres doublets cdk-cycline d'une part par son activation en l'absence de phosphorylation de sa boucle T due à son association à MAT1 et d'autre part par son activité kinase constitutive tout au long du cycle cellulaire (Poon *et al.*, 1994 ; Tassan *et al.*, 1994).

La cycline H, est une protéine de 38 kDa composée de 323 acides aminés dont l'homologue chez la levure est CCL1 (Valay *et al.*, 1993). La partie centrale de la cycline H contient 2 répétitions directes d'une centaine d'acides aminés qui forment 2 séries symétriques de 5 hélices α . Ce motif constitue la boîte cycline caractéristique de toutes les cyclines et permet l'interaction avec cdk7. De plus, sa structure cristallographique montre de grandes similitudes avec celle de la cycline A (Andersen *et al.*, 1996). La cycline A est ainsi capable de remplacer la cycline H au sein du CAK permettant la phosphorylation *in vitro* d'un oligonucléotide mimant le CTD de l'ARNP II (Andersen *et al.*, 1997). Il faut noter que la cycline H peut être phosphorylée par cdk8/cycline C ce qui aurait pour effet d'inhiber cdk7 ainsi que la transcription (Akoulitchev et Reinberg, 1998).

MAT1, est un polypeptide de 312 acides aminés ayant un poids moléculaire de 32 kDa. MAT1 possède dans sa partie amino-terminale un motif structural de liaison au zinc de type 'ring finger' ainsi qu'un domaine 'coiled-coil' dans sa partie centrale. Le motif 'ring finger' lie le complexe cdk7-cycline H et est essentiel à l'activation de cdk7 ainsi qu'à l'activité de transcription de TFIIH. Le domaine 'coiled coil' quant à lui permet l'intégration du CAK au cœur de TFIIH via les sous-unités XPB et XPD (Busso *et al.*, 2000). MAT1 stimule la phosphorylation d'un oligopeptide mimant le CTD de l'ARNP II par cdk7 et est essentiel à la phosphorylation *in vitro* de p53 par cdk7 (Ko *et al.*, 1997 ; Yankulov et Bentley, 1997). De même que cdk7 et cycline H, MAT1 est la cible potentielle pour l'inactivation de l'activité de transcription de TFIIH durant la mitose de part sa phosphorylation par le couple cdk1-cycline B (Long *et al.*, 1998).

2. Structure tridimensionnelle de TFIIH

L'architecture moléculaire de TFIIH, d'homme et de levure, a été résolue par microscopie électronique (Chang et Kornberg, 2000 ; Schultz *et al.*, 2000) (figure 22). La structure de TFIIH humain hautement purifié et du cœur de TFIIH recombinant a été résolue à 3.8 nm (Schultz *et al.*, 2000).

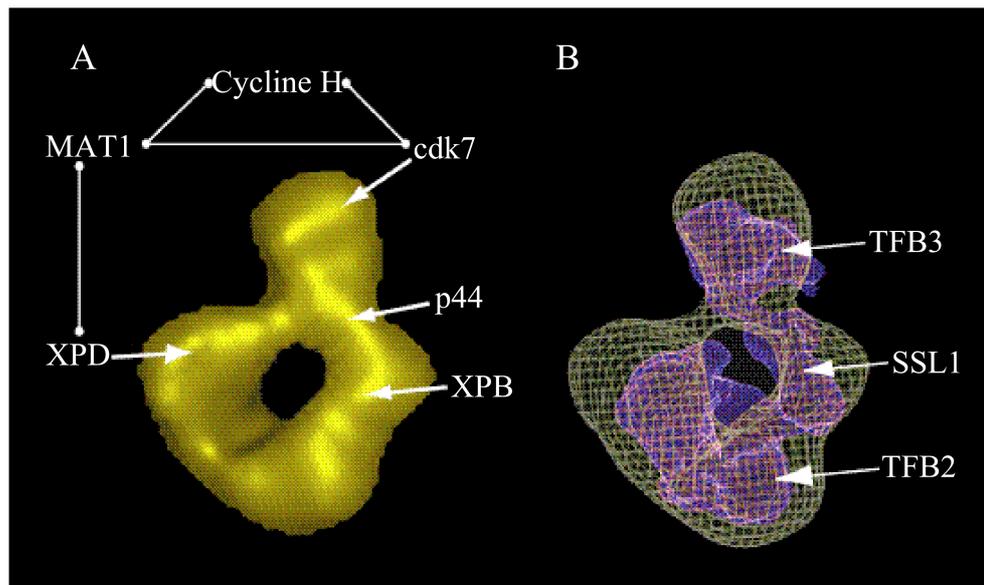


Figure 22 □ Architecture moléculaire de TFIIH d'homme (A) et de levure (B). (D'après (Chang et Kornberg, 2000 ; Schultz *et al.*, 2000)).

TFIIH a une taille d'environ 16 x 12,5 x 7,5 nm et présente une structure en forme d'anneau (avec un trou central de 3,5 x 2,5 nm) ainsi qu'une protubérance au dessus de cet anneau. La comparaison de structure de TFIIH avec celle du cœur de TFIIH a permis de montrer que cette protubérance correspondait au sous-complexe CAK. Des expériences d'immunolocalisation, combinées à la microscopie électronique, ont permis de localiser les différentes sous-unités de TFIIH au sein de cette structure (figure 22). Cdk7 se trouve dans la protubérance de la structure tridimensionnelle confirmant l'appartenance du CAK à cette protubérance. XPD se retrouve dans l'anneau entre le CAK et le cœur de TFIIH montrant ainsi son rôle dans l'ancrage du CAK au cœur probablement grâce à son interaction avec MAT1 (Busso *et al.*, 2000). p44 est positionné dans l'anneau proche de XPD avec lequel il interagit (Coin *et al.*, 1998 □ Seroz *et al.*, 2000). Enfin, XPB se trouve aussi dans cet anneau près de p44 mais opposé à XPD. Ces 2 hélicases interagissent avec leurs parties amino-terminales □ on peut donc imaginer que ces domaines se retrouvent associés dans l'arrière plan de la structure de TFIIH (Iyer *et*

al., 1996). La position de p62, p52 et p34 est moins bien déterminée. Il semblerait aussi que chaque sous-unité de TFIIH soit présente en un seul exemplaire au sein du complexe (Schultz *et al.*, 2000 ; Winkler *et al.*, 1998).

La structure de TFIIH de levure hautement purifié, comprenant les sous-unités RAD3 (XPD), TFB1 (p62), TFB2 (p52), SSL1 (p44) et TFB4 (p34) a été obtenue par microscopie électronique en parallèle de celle de TFIIH humain (Chang et Kornberg, 2000 ; Takagi *et al.*, 2003). La sous-unité RAD25 (XPB) et le sous-complexe CAK de levure ont été perdus lors de l'étape de purification de TFIIH (Chang et Kornberg, 2000). Il y a quelques mois encore, la sous-unité TFB3 (MAT1) était attribuée au cœur de TFIIH plutôt qu'au sous-complexe CAK. Cette différence entre les complexes humains et de levure a été expliquée, il y a peu, par l'équipe de Kornberg, montrant ainsi une parfaite homologie entre la composition des TFIIH des 2 espèces (Takagi *et al.*, 2003). Ainsi, l'architecture moléculaire de TFIIH de levure est fortement comparable à celle du complexe humain, reflétant une grande conservation de ce facteur entre les eucaryotes supérieurs et inférieurs (Chang et Kornberg, 2000 ; Schultz *et al.*, 2000) (figure 22).

3. Fonctions de TFIIH au sein de la cellule

TFIIH est un bon exemple de facteur clef au sein de la cellule, car il se trouve impliqué dans divers processus cellulaires fondamentaux : la transcription des gènes de classe I et II, la NER, le cycle cellulaire et l'apoptose.

3.1 TFIIH et la transcription des gènes de classe II

Durant l'initiation de la transcription, l'hélicase XPB ouvre la double hélice d'ADN autour du +1 et permet à l'ARNP II d'échapper le promoteur. L'activité de XPD n'est pas requise dans ces 2 étapes mais sa présence l'est, impliquant un rôle plus structural pour XPD (Bradsher *et al.*, 2000 ; Moreland *et al.*, 1999). Cdk7 est la kinase responsable de la phosphorylation du CTD de l'ARNP II, lors de l'échappée du promoteur (voir section I.4). Outre son rôle dans l'initiation, TFIIH est un élément crucial dans la régulation de la transcription. En effet, TFIIH interagit avec de nombreux facteurs de transcription dont : la protéine X du virus de l'hépatite B (HBX), la protéine du virus de l'herpes (VP16), le répresseur interagissant avec FBP (FIR), BRCA1, p53 et différents récepteurs nucléaires phosphorylés par cdk7 (Haile et Parvin, 1999 ; Liu *et al.*,

2000a ; Qadri *et al.*, 1996 ; Xiao *et al.*, 1994 ; Zurita et Merino, 2003). Des mutations dans XPD peuvent altérer l'activité kinase de cdk7, ce qui induit un défaut de phosphorylation du récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque, et une inhibition de son activité transcriptionnelle. L'effet de ces mutants de XPD sur l'activité des récepteurs nucléaires permet d'expliquer certains phénotypes observés chez les patients XP (Keriel *et al.*, 2002). Il a récemment été montré que MAT1 pouvait interagir avec la protéine MTA1 qui en retour inhiberait l'activité kinase de TFIIH nécessaire à l'expression de gènes dépendant des récepteurs aux œstrogènes (Talukder *et al.*, 2003). Il apparaît donc que TFIIH est un facteur clef pour les différentes étapes de la transcription de par son interaction avec de nombreux facteurs transcriptionnels. TFIIH pourrait ainsi réguler l'expression de certains gènes de manière spacio-temporelle. Enfin, une interaction entre TFIIH et l'U1 ARNs a été établie, reflétant le rôle de TFIIH dans l'épissage des ARNpré-m (Kwek *et al.*, 2002).

TFIIH serait aussi impliqué dans l'étape de terminaison de la transcription (voir section I.4). En effet, la phosphorylation du CTD de l'ARNP II par cdk7 est nécessaire à la maturation co-transcriptionnelle de l'ARNpré-m (**publication 1**).

3.2 TFIIH et la transcription des gènes de classe I

L'ARNP I transcrit les ARN ribosomiaux (ARNr). Cette enzyme nécessite, comme l'ARNP II, un certain nombre de facteurs auxiliaires pour initier la transcription des ARNr. Le facteur TIF-IB coopère avec UBF, un membre de la famille des protéines HMG, pour catalyser le recrutement et la fixation de l'ARNP I et des facteurs auxiliaires TIF-IA et TIF-IC sur le promoteur des gènes ribosomiques (Grummt, 1999). Il a récemment été montré que TFIIH participait à la transcription des gènes de classe I (Hoogstraten *et al.*, 2002 ; Iben *et al.*, 2002). En effet, TFIIH co-purifie avec le complexe TIF-IB et l'ARNP I après différentes chromatographies ou immunoprécipitations. De plus, une portion non négligeable de TFIIH se trouve localisée *in vivo* dans les nucléoles (sites de synthèse des ARNr). Un système reconstitué *in vitro* de transcription des ARNr n'est plus actif si TFIIH est absent. Ce système redevient actif après l'ajout de ce facteur. De plus, des mutants de levure thermosensibles pour certaines sous-unités de TFIIH montrent un défaut de transcription de l'ARNr 35S. TFIIH serait requis pour l'élongation de la transcription des ARNr plus que pour l'initiation. En effet, l'ATP et les activités kinase et ATPases de TFIIH ne sont pas nécessaire à l'initiation de la transcription des ARNr. Malgré toutes ces évidences, le rôle précis de TFIIH dans la transcription des gènes

de classe I reste à être déterminé. Il est important de noter que certains phénotypes observés chez les patients CS peuvent être dus à un défaut de transcription des ARNr puisque la protéine CSB est impliquée dans ce mécanisme (Bradsher *et al.*, 2002).

3.3 TFIIH et la NER

Les 2 hélicases de TFIIH ouvrent, de façon dépendante de l'ATP, l'ADN autour de la lésion lors de la réaction de NER (voir section II.1). Des mutations dans les gènes codant ces protéines sont d'ailleurs à l'origine de maladies génétiques rares (voir section II.4). Pour autant, l'implication de TFIIH dans la NER ne se limite pas à la fonction de ses hélicases, puisque la réparation d'un substrat pré-ouvert ne s'effectue pas en son absence (Mu *et al.*, 1997). TFIIH établit de multiples contacts avec les protéines de la NER (XPA, XPC, XPF-ERCC1 et XPG) et jouerait un rôle dans la formation du complexe de réparation (Riedl *et al.*, 2003). De plus, il régule les activités des endonucléases XPG et XPF-ERCC1 (Winkler *et al.*, 2001).

Le rôle du sous-complexe CAK est plus controversé. La réaction de NER reconstituée *in vitro* est inhibée par le CAK, et l'ajout d'un inhibiteur de cdk7 compense cette inhibition. Le CAK pourrait donc réguler négativement certains facteurs de la NER en les phosphorylant (Araujo *et al.*, 2000). L'exposition de cellules humaines aux rayons UV réduit l'activité kinase de cdk7 et les facteurs de la NER retrouvent leur activité, confortant l'hypothèse précédente (Adamczewski *et al.*, 1996). Cependant, l'injection d'anticorps anti-cdk7 dans des cellules humaines inhibe fortement la NER (Roy *et al.*, 1994). De plus, une souche de levure portant une mutation dans l'homologue de MAT1 (TFB3) est sensible aux rayons UV (Feaver *et al.*, 2000). Néanmoins, dans un système reconstitué *in vitro* chez la levure le CAK n'est pas indispensable pour l'étape d'incision (Sung *et al.*, 1996 ; Svejstrup *et al.*, 1995).

Enfin, il faut noter que TFIIH participe au mécanisme général de TCR. En effet, des mutations dans TFIIH inhibent la TCR des lésions réparées par BER ou NER (Le Page *et al.*, 2000).

3.4 TFIIH et le cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire chez l'homme est contrôlée par l'activation et l'inactivation successive d'au moins 5 paires de cdk-cycline (Arellano et Moreno, 1997). Une des étapes d'activation est la phosphorylation de Thr dans la loupe T des cdk par la kinase du CAK

(cdk7) lorsque celui-ci se trouve sous forme libre dans la cellule (au moins 50% des sous-complexes CAK seraient sous-forme libre). En effet, CAK associé au cœur de TFIIH est plus spécifique envers les facteurs de transcription qu'envers les cdk (Rossignol *et al.*, 1997 ; Yankulov et Bentley, 1997). Il n'y a pas de preuves que cdk7 associée à TFIIH soit impliquée dans le cycle cellulaire. Au contraire, la phosphorylation de cdk7 lors de la mitose, par cdk2 et cdk8, inhibe l'activité transcriptionnelle de TFIIH (Long *et al.*, 1998).

Plusieurs expériences ont montré que le CAK était important pour l'activation des cdk *in vivo*. L'immunodéplétion de cdk7 d'extraits d'œufs de Xénope inhibe l'activité du CAK ; cette activité peut être rétablie après complémentation de ces extraits avec l'ARNm codant pour cdk7 (Fesquet *et al.*, 1997). Des drosophiles portant des mutations dans cdk7 montrent un défaut d'activation de cdk1 ; ce défaut peut être inversé par des complexes cdk7-cycline H purifiés (Larochelle *et al.*, 1998). Enfin, les trophoblastes de souris mutantes pour MAT1 ne sont plus capables d'entrer dans la phase S du cycle cellulaire (Rossi *et al.*, 2001).

Néanmoins, il faut noter que certaines données contredisent l'implication du CAK comme régulateur du cycle cellulaire. En effet, chez la levure, l'activité CAK a été attribuée à la kinase CAK1 et l'homologue de cdk7 (KIN28) ne possède pas d'activité CAK (Cismowski *et al.*, 1995 ; Thuret *et al.*, 1996).

3.5 TFIIH et l'apoptose

L'hypothèse selon laquelle TFIIH est impliqué dans le mécanisme d'apoptose est née de la découverte d'une interaction entre 5 sous-unités de TFIIH et la protéine p53. En effet, XPB, XPD, p62, la cycline H et MAT1 interagissent avec p53 (Xiao *et al.*, 1994). Ces interactions inhibent les activités enzymatiques de TFIIH. En effet, l'interaction entre p53 et XPB/XPD conduit à une inhibition de leurs activités hélicases et l'interaction entre p53 et la cycline H résulte en une diminution significative de l'activité kinase de cdk7 (Leveillard *et al.*, 1996 ; Schneider *et al.*, 1998). D'autre part, cdk7 phosphoryle p53, ce qui a pour effet d'augmenter son activité de liaison à des séquences spécifiques d'ADN (Lu *et al.*, 1997). Cette activation de p53 pourrait, par conséquent, stimuler l'expression du gène codant pour l'inhibiteur de cdk, *p21^{CIP1}*, menant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Ko et Prives, 1996).

Après un choc génotoxique, comme une irradiation aux UV, on observe une accumulation de p53, qui coïncide avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 permettant la réparation de l'ADN (Agarwal *et al.*, 1998). Par ailleurs, il n'est pas possible d'induire l'apoptose médiée par

p53 dans des cellules dont les gènes *XPB* ou *XPD* sont mutés, mais la transfection de ces cellules par des vecteurs contenant ces 2 gènes permet l'induction de l'apoptose (Wang *et al.*, 1996). L'inhibition des activités hélicases de TFIIH par p53 retarderait la NER et pourrait ainsi entraîner l'apoptose.

RESULTATS

PUBLICATION 2

PUBLICATION 2

Des mutations dans XPB et XPD, retrouvées chez des patients atteints de *Xeroderma pigmentosum*, dérèglent l'activité de transcription de TFIIH

TFIIH est un facteur général de la transcription composé de 9 sous-unités. TFIIH est aussi impliqué dans la réparation par excision de nucléotides. Ses 2 hélicases (XPB et XPD), dépendantes de l'ATP, se retrouvent mutées chez les patients atteints de maladies génétiques rares : le *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD). La pléiotropie des symptômes observés chez ces patients ne peut s'expliquer par le seul défaut de NER de TFIIH.

Pour examiner l'activité transcriptionnelle de TFIIH mutés chez les patients XP, nous avons mis au point une technique d'immunopurification de TFIIH à partir de cellules de patients atteints de cette maladie. En effet, cette technique permet de purifier le facteur étudié à partir d'une faible quantité de cellules en comparaison aux techniques de purification classiques employées par le passé (Hwang *et al.*, 1996).

Nous avons ainsi pu montrer que l'hélicase XPB, mutée chez 2 patients XP/CS, provoque une diminution de l'activité transcriptionnelle de TFIIH due à un défaut d'ouverture du promoteur lors de l'initiation de la transcription. Ce défaut de XPB en transcription peut être supprimé par un promoteur artificiellement pré-ouvert. Une mutation dans XPD affecte la composition stœchiométrique de TFIIH due à un manque d'interaction entre XPD et le CAK. Ce manque d'interaction empêche l'intégration correcte du CAK au cœur de TFIIH résultant en une diminution de l'activité transcriptionnelle de ce dernier. XPD aurait donc un rôle plus structural au sein de TFIIH. Enfin, la présence de p44c ou p44c/t dans TFIIH ne modifie pas les activités de base de ce facteur.

Ce travail a donc permis de clarifier le rôle de différentes sous-unités de TFIIH et de montrer que les patients XP-B et XP-D souffrent plus d'un syndrome de réparation/transcription que d'un syndrome de réparation seul.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Frédéric Coin, Etienne Bergmann, **Alexandre Tremeau-Bravard**, and Jean-Marc Egly
Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair
the transcription function of TFIIH.

The EMBO Journal 18 (1999), 1357-1366

Pages 1357-1366 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/emboj/journal/v18/n5/full/7591567a.html&filetype=pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION 3

PUBLICATION 3

Rôle de la partie carboxy-terminale de p44 dans l'activité d'échappée du promoteur de TFIIH

p44 est une sous-unité essentielle au sein de TFIIH dans le sens où elle régule l'activité hélicase de XPD. p44 interagit avec XPD grâce à sa partie amino-terminale qui confère à la levure une hypersensibilité aux rayons UV lorsqu'elle se retrouve mutée (Wang *et al.*, 1995). Un défaut d'interaction entre ces 2 sous-unités, dû à une mutation dans XPD, peut être la cause de certains phénotypes observés chez les patients XP (Coin *et al.*, 1998 ; Seroz *et al.*, 2000). p44 possède dans sa partie carboxy-terminale 2 domaines caractéristiques : un motif en 'doigt de zinc' et un motif 'ring finger-like'.

Afin de déterminer le rôle de cette partie carboxy-terminale nous avons construit des p44 mutés dans les acides aminés conservés, importants pour la fixation du zinc, au sein des 2 motifs de ce domaine. Les TFIIH mutés dans p44 ont été produits à partir de cellules d'insectes infectées avec des baculovirus contenant toutes les sous-unités de ce facteur. Ces TFIIH ont ensuite été testés pour leurs activités de base.

Nous avons ainsi pu démontrer que : 1) le motif en 'doigt de zinc' est essentiel au maintien de la structure de TFIIH et plus particulièrement à l'intégration de la sous-unité p62 au sein du complexe TFIIH. 2) le motif 'ring finger-like' a un rôle plus fonctionnel car il est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de TFIIH, lors de l'échappée du promoteur (étape suivant l'initiation de la transcription).

Cette étude a donc permis d'établir une nouvelle fonction de TFIIH lors de l'échappée du promoteur par l'ARNP II et de montrer le rôle de p44 dans la cohésion du complexe TFIIH.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Alexandre Tremeau-Bravard, Christophe Perez, and Jean-Marc Egly

A role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of transcription factor IIIH.

The Journal of Biological Chemistry 276 (2001), 27693-27697

Pages 27693-27697 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://intl.jbc.org/cgi/reprint/276/29/27693>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION 4

PUBLICATION 4

Devenir de l'ARNP II bloquée sur une lésion cisplatine

La réparation des lésions sur le brin transcrit de l'ADN est plus efficace que la réparation des lésions se trouvant n'importe où dans le génome. L'ARNP II bloquée par une lésion semble être le signal pour le recrutement des facteurs de réparation, expliquant ainsi ce mode de réparation préférentiel. Ce signal pourrait être relayé par une protéine nommée CSB, qui se retrouve mutée chez les patients atteints du syndrome de Cockayne, et dont les cellules présentent un défaut de TCR. De plus, nous ne savons pas si l'ARNP II arrêtée par une lésion est dégradée ou éjectée de l'ADN.

Pour mieux comprendre le mécanisme de TCR nous avons construit une matrice d'ADN, fixée sur des billes magnétiques, contenant une lésion cisplatine unique se trouvant à un endroit précis. Cette matrice est un substrat efficace pour les réactions de transcription et de réparation *in vitro*. Elle permet également le contrôle du milieu réactionnel et de ne laisser qu'une seule molécule d'ARNP II par molécule d'ADN transcrite. Enfin, grâce au marquage radioactif de l'ARNP II il est possible de suivre le devenir de cette dernière après la réaction de réparation.

Nous avons ainsi pu montrer que l'ARNP II bloquée sur la lésion cisplatine est éjectée de l'ADN de façon dépendante de l'ATP grâce à un facteur non identifié ne faisant pas partie de la machinerie de réparation. De plus, il nous a été possible de mettre en évidence le rôle de CSB dans l'inhibition du recul de l'ARNP II lorsque celle-ci rencontre la lésion. Enfin, en utilisant des anticorps dirigés contre l'ARN, nous avons confirmé qu'une ARNP II bloquée sur une lésion n'inhibe pas la réaction d'excision du nucléotide endommagé.

Ces travaux ont donc permis d'éclaircir le mécanisme de TCR. Cependant, il reste à déterminer le déroulement exacte de la réaction de TCR *in vivo*.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Alexandre Tremeau-Bravard, Thilo Riedl, Jean-Marc Egly, and Michael E. Dahmus

Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion.

The Journal of Biological Chemistry 279 (2004), 7751-7759

Pages 7751-7759 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/9/7751>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

DISCUSSION

DISCUSSION

TFIIH est un facteur clef dans la cellule dans le sens où il participe à deux mécanismes fondamentaux que sont la transcription des gènes codant pour les protéines et la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). L'étude de ce facteur est donc cruciale pour la compréhension de ces mécanismes et des maladies génétiques qui leur sont associées : le *Xeroderma pigmentosum*, le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie. La NER peut être couplée à la transcription (TCR) dans un mécanisme par lequel les lésions sur le brin transcrit de l'ADN sont réparées de façon préférentielle par rapport au reste du génome. Mon travail de thèse aura permis de mieux comprendre : 1) la fonction de certaines protéines de TFIIH, dont en particulier la partie carboxy-terminale de p44 et 2) le mécanisme de TCR ainsi que le devenir de l'ARNP II durant ce processus. Néanmoins, des questions subsistent quant au déroulement de la TCR *in vivo*. Ces questions pourraient être résolues grâce aux nouvelles techniques de microscopie. Je discuterai donc dans ce chapitre, de l'importance de p44 au sein de TFIIH et des avancées récentes sur la compréhension du mécanisme de TCR. Je tenterai aussi de montrer l'importance de la microscopie dans la compréhension des phénomènes biologiques.

1. p44 : protéine clef au sein de TFIIH

L'homologue de levure de p44 (SSL1) fut découvert lors de l'identification de protéines capables de corriger un défaut de traduction chez la levure (Yoon *et al.*, 1992). Par la suite, il a été montré que SSL1 et p44 faisaient partie du complexe TFIIH de levure et d'homme, respectivement (Feaver *et al.*, 1993 ; Humbert *et al.*, 1994). p44/SSL1 est indispensable à l'activité de transcription et de réparation de TFIIH (Seroz *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 1995). En effet, des mutations dans *SSL1* confèrent à la levure une hypersensibilité aux rayons UV et sont léthales aux températures non permissives (Wang *et al.*, 1995). p44 a un rôle crucial au sein de TFIIH car il régule de façon positive l'activité hélicase de XPD (Coin *et al.*, 1998). La partie

amino-terminale de p44 interagit avec XPD et des mutations dans cette partie, empêchant cette interaction, inhibent l'activité transcriptionnelle de TFIIH (Seroz *et al.*, 2000). On peut supposer qu'aucune mutation de p44 n'ait été associée à une maladie génétique de la réparation du fait que le gène correspondant soit dupliqué chez l'homme (Burglen *et al.*, 1997) (voir figure 21).

C'est sur la base de ces observations que nous avons décidé de définir le rôle des 2 motifs particuliers ('doigt de zinc' et 'ring finger-like') présents dans l'autre extrémité de p44 la partie carboxy-terminale (**publication 3**) (voir figure 21). Dans un premier temps, nous avons conçu des protéines p44 contenant des mutations ponctuelles dans les acides aminés conservés du 'ring finger-like' susceptibles de chélater 2 atomes de zinc. En effet, les Cys-345, 348, 368 et 371 chélatent un atome de zinc, alors que les Cys-360 et 363, en association avec un des quatre résidus suivants : His-376, His-380, Cys-382 et Cys-385, chélatent le deuxième atome de zinc de ce domaine (Fribourg *et al.*, 2000). Nous avons donc muté en Ala les Cys-345, 360, 363 et 382 et les His-376 et 380. Sachant que ces résidus chélatent 2 atomes de zinc au sein du 'ring finger-like' de p44, il était prévisible que de telles mutations affectent la structure de p44 et donc la fonctionnalité de TFIIH. Or nous avons remarqué qu'aucune d'entre elles n'affectait l'activité transcriptionnelle de TFIIH. Nous pouvons donc conclure que 3 acides aminés sont suffisants pour la chélation d'un atome de zinc au sein de la structure 'ring finger-like' de p44. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de construire des protéines p44 portant des doubles mutations. Notre choix s'est porté sur les 2 Cys liant un atome de zinc (Cys-360/363) et sur les 2 His supposées lier ce même atome de zinc (His-376/380). C'est ainsi que nous avons constaté que de telles mutations affectent l'activité transcriptionnelle de TFIIH. Ce défaut de transcription n'est pas dû à un manque d'interaction entre XPD et les p44 mutés. De plus, les activités de base de TFIIH (ATPase, hélicase) et l'intégration du CAK au sein du complexe ne sont pas affectées. Ces observations semblent logiques dans le sens où c'est la partie amino-terminale qui est importante pour l'interaction de p44 avec XPD. Il fut surprenant de constater que l'étape d'échappée du promoteur est déficiente chez ces TFIIH mutés alors que la formation de la première liaison phosphodiester n'est pas affectée. Il était connu que TFIIH, à travers son hélicase XPB, est impliqué dans cette étape (Moreland *et al.*, 1999) ; le fait qu'une sous-unité sans activité enzymatique puisse participer à ce processus est complètement nouveau. Nous pouvons imaginer que la structure du 'ring finger-like' est importante pour le positionnement correct de XPB lors de l'échappée du promoteur ou alors que

ce domaine permet une dissociation de l'ADN, qui enveloppe l'ARNP II/TFIIF, lors de cette étape (Robert *et al.*, 1998).

Pour tester le rôle du motif en 'doigt de zinc' de p44, nous avons remplacé deux des quatre Cys liant un atome de zinc (Cys-291 et 308) par une Ala. Après immunopurification des TFIIH correspondants, nous avons constaté que ceux-ci ne possédaient plus la sous-unité p62. Ceci n'est pas dû à une diminution de l'interaction entre p62 et ces p44 mutés puisque celle-ci a pu être mise en évidence dans des expériences de co-immunoprécipitation *in vitro*. De plus, ni une déplétion complète de p44 ni les mutations dans son motif 'ring finger-like' n'empêchent l'intégration de p62 au sein du complexe TFIIH, suggérant ainsi le rôle spécifique de la structure en 'doigt de zinc' dans l'organisation et la cohésion de TFIIH.

p44 est donc une protéine essentielle pour la structure et la fonction de TFIIH. Il n'est pas étonnant qu'elle soit indispensable à la viabilité de la levure. Il pourrait être intéressant de déterminer la structure tridimensionnelle de TFIIH portant de telles mutations dans la partie carboxy-terminale de p44. Il ne serait pas surprenant de constater une déformation complète de la structure en anneau de ces TFIIH (Schultz *et al.*, 2000).

L'étude de chaque sous-unité de TFIIH, possible grâce à la reconstitution de complexes recombinants, est importante pour la compréhension du fonctionnement de ce facteur et donc de son rôle dans les différentes maladies génétiques associées. Outre l'étude approfondie de ses deux hélicases XPB et XPD, les mêmes techniques de reconstitution de TFIIH recombinants ont été entreprises pour analyser la fonction des sous-unités MAT1 et p52 (Busso *et al.*, 2000 ; Jawhari *et al.*, 2002).

Enfin, la production de souris 'knock out' pour p44 permettrait de mieux comprendre la fonction de cette protéine *in vivo*. De telles souris ont été produites pour le gène *ERCC2* (*XPD*) et la léthalité des embryons *ERCC2*^{-/-} montre l'importance de XPD dans l'activité de transcription de TFIIH. Un tel résultat serait probablement retrouvé chez les souris *p44*^{-/-} ; c'est pourquoi l'utilisation du système Cre-Lox, permettant l'inactivation contrôlée en temps et en lieu d'un gène donné, s'avèrerait utile pour l'étude de protéines ayant des activités aussi cruciales que la transcription des gènes de classe II (Metzger et Chambon, 2001). On pourrait aussi imaginer la reproduction de mutations ponctuelles, chez la souris, mimant par exemple la mutation *SSL1* de levure.

2. L'ARNP II : signal du mécanisme de TCR ?

L'implication de TFIIH dans les mécanismes de transcription et de réparation de l'ADN nous a amené à étudier le mécanisme de TCR par lequel une lésion se trouvant sur le brin transcrit de l'ADN, et bloquant la progression de l'ARNP II, est éliminée plus rapidement qu'une lésion se trouvant ailleurs sur le génome. Malgré plus de 17 ans d'études, ce mécanisme reste mal compris chez l'homme et seules des hypothèses ont pu être établies (Svejstrup, 2002 ; Svejstrup, 2003). L'importance de la TCR est révélée par le fait que des patients ne pouvant plus réparer de façon préférentielle une lésion se trouvant sur le brin transcrit de l'ADN souffrent d'une maladie génétique rare : le syndrome de Cockayne (CS). Les cellules de patients mutées dans l'un des 2 facteurs CSA et CSB sont déficientes dans ce mécanisme et ne retrouvent pas un taux de transcription normal après l'induction de dommages sur leur ADN (de Boer et Hoeijmakers, 2000). Puisque CSB, et non CSA, possède une activité enzymatique capable de remodeler la chromatine (ATPase de type SWI/SNF), la plupart des études ont été menées sur la fonction de cette protéine (Citterio *et al.*, 2000). Chez la bactérie, le facteur TRCF reconnaît l'ARNP II arrêtée au niveau d'une lésion, la déplace et recrute la machinerie de réparation (Selby et Sancar, 1993). Chez l'homme, CSB (homologue de TRCF) ne semble pas remplir cette fonction puisque qu'il n'est pas capable de déplacer l'ARNP II bloquée sur une lésion (Selby et Sancar, 1997b). L'ARNP II pourrait être à l'origine du signal de déclenchement de la TCR puisque l'addition d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme (l' α -amanitine) inhibe ce mécanisme (Christians et Hanawalt, 1992). Sachant d'une part, que l'ARNP II bloquée par une lésion permettrait le recrutement de la machinerie de réparation et d'autre part que cette même polymérase empêche l'accès de la lésion par les facteurs de NER (ou BER), 2 questions se posent : 1) que devient l'ARNP II bloquée par une lésion lors de la TCR et 2) comment les facteurs de NER peuvent-ils accéder à cette lésion ?

C'est pour tenter de répondre à ces questions que nous avons mis au point un système dans lequel le devenir de l'ARNP II peut être suivi par marquage radioactif. Ce système *in vitro* utilise un ADN, fixé sur des billes magnétiques, contenant une seule lésion cisplatine à un endroit précis (**publication 4**). Les résultats obtenus dans cet article sont à première vue contradictoires mais confirment certaines hypothèses déjà établies. En effet, nous avons montré que l'ARNP II bloquée par une lésion cisplatine était éjectée de l'ADN de façon dépendante de l'ATP par un facteur inconnu faisant partie de l'extrait cellulaire. Cette éjection est indépendante du mécanisme de réparation puisqu'elle est aussi observée avec l'utilisation

d'extraits cellulaires déficients pour les protéines de réparation CSB et TFIIF. De plus, l'ARNP II peut également rester sur l'ADN et reculer (ou c'est l'ARN qui est raccourci) et ce de façon indépendante de l'ATP et de la réparation. Enfin, l'excision de la lésion, par des facteurs de réparation humains hautement purifiés, peut se produire en présence de la polymérase arrêtée par le cisplatine.

L'incubation de l'ARNP II, bloquée par la lésion cisplatine, avec un extrait cellulaire sauvage et en absence de tous nucléotides provoque le raccourcissement de l'ARN sans l'éjection de l'ARNP II. L'ARNP II est capable de réinitier la transcription après ce raccourcissement si l'on rajoute des NTPs au milieu (**publication 4**). Il est probable que ce mécanisme soit dû au facteur TFIIS qui est connu pour activer l'activité endonucléase de l'ARNP II (Reines, 1992). En effet, il a déjà été montré que ce facteur était capable d'induire le raccourcissement de l'ARN d'un complexe ternaire ARN-ADN-ARNP II bloqué par une lésion CPD ou cisplatine (Tornaletti *et al.*, 2003 ; Tornaletti *et al.*, 1999). Cependant, le fait que l'ATP, essentiel à la réaction de TCR, ne soit pas nécessaire à ce raccourcissement nous laisse penser que ce phénomène n'a pas lieu lors de la réaction de TCR.

En utilisant la même approche expérimentale, nous avons constaté que le complexe ARN-ARNP II, bloqué sur la lésion cisplatine, se retrouve éjecté de l'ADN de façon dépendante de l'ATP. Cette éjection pourrait être due au facteur HuF2, possédant une activité ATPase et connu pour être impliqué dans la dissociation de l'ARNP II de l'ADN (Liu *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que ce facteur pouvait dissocier de l'ADN les ARNP I et II bloqués par une lésion CPD (Hara *et al.*, 1999). Le fait que des extraits cellulaires, déficients pour les protéines de réparation CSB et TFIIF, permettent toujours cette dissociation du complexe ARN-ARNP II de l'ADN, de façon dépendante de l'ATP, nous laisse penser qu'un tel mécanisme n'est pas directement lié à la réaction de TCR *in vivo*. Cette dissociation rendrait la lésion accessible aux facteurs de réparation pour permettre la GGR en absence de TCR. On peut imaginer qu'un tel mécanisme ait lieu en cas de persistance de l'ARNP II sur la lésion. L'immunodéplétion d'extraits cellulaires du facteur HuF2, grâce à des anticorps dirigés contre cette protéine, nous permettrait de savoir s'il est directement impliqué dans la dissociation du complexe ARN-ARNP II de l'ADN observée dans ce type d'expérience.

Nous avons aussi pu montrer que l'incision du fragment d'ADN endommagé par les 6 facteurs humains hautement purifiés nécessaires à cette étape (voir section II.1) n'était pas inhibée par la présence de l'ARNP II sur la lésion cisplatine. De plus, l'incision de la lésion ne résulte pas en la dissociation de l'ARNP II de l'ADN. Ces résultats peuvent paraître surprenants

dans le sens où l'ARNP II recouvre complètement les sites d'incision de l'ADN des endonucléases XPF-ERCC1 et XPG et peut inhiber la réaction de réparation par la photolyase bactérienne (Selby *et al.*, 1997 ; Tornaletti *et al.*, 1999). Les différents systèmes utilisés entre notre étude et celle de Tornaletti *et al.* pourraient expliquer ces résultats contradictoires (Tornaletti *et al.*, 1999) (**publication 4**). L'équipe de Sancar a pu montrer que la réparation d'une lésion CPD n'était pas inhibée par la présence de l'ARNP II, confirmant ainsi la validité de nos résultats (Selby *et al.*, 1997).

Enfin, nous avons voulu étudier le rôle de CSB dans le relargage de l'ARNP II de l'ADN. Pour cela, nous avons immunodéplété un extrait cellulaire de la protéine CSB. Cette immunodéplétion n'affecte ni l'activité transcriptionnelle ni celle de réparation de l'extrait ainsi obtenu. En utilisant cet extrait dans l'essai de relargage de l'ARNP II, dépendant de l'ATP, nous avons constaté que le complexe ARN-ARNP II se trouvait plus en amont de la lésion. Ce raccourcissement de l'ARN est plus prononcé que celui observé avec l'utilisation d'un extrait cellulaire sauvage. Cet effet peut être annulé en rajoutant la protéine CSB recombinante dans l'extrait immunodéplété. L'équipe de Sancar a pu montrer que CSB permettait l'ajout d'un nucléotide par l'ARNP II lorsque celle-ci se retrouve bloquée sur une lésion CPD (Selby et Sancar, 1997a). De plus, la même étude a montré que CSB empêchait la dégradation de l'ARN par TFIIS dans les mêmes circonstances. Ces résultats montrent qu'une des fonctions de CSB est de rapprocher l'ARNP II de la lésion. Une étude récente a également montré que le facteur TRCF (homologue bactérien de CSB) était capable de déplacer plus en aval sur l'ADN une ARNP II bloquée par une lésion (Park *et al.*, 2002). Il est proposé que TRCF utiliserait son activité ATPase pour tirer l'ADN en dessous de l'ARNP II, déplaçant ainsi cette dernière plus en aval sur l'ADN. Ce mécanisme pourrait être conservé chez CSB qui, en utilisant son activité ATPase de type SWI/SNF, remodelerait l'interface ADN-ARNP II, poussant ainsi l'ARNP II vers la lésion. Cette activité pourrait même, dans certains cas, permettre à l'ARNP II de passer à travers la lésion.

Les 2 derniers résultats évoqués précédemment (incision de la lésion en présence de l'ARNP II et activité de translocation plus en aval sur l'ADN de l'ARNP II par CSB) nous permettent d'établir un modèle pour le mécanisme de TCR. En effet, on peut imaginer que l'ARNP II, si elle n'est pas éjectée de l'ADN parce que la réparation de la lésion est trop lente, peut être maintenue en face du dommage grâce à l'activité ATPase de CSB. Ce maintien à proximité du dommage permettrait en retour à CSB, de par ses nombreuses interactions avec les protéines de réparation de l'ADN, de recruter la machinerie de NER ou de BER. L'incision du

fragment lésé pourrait ensuite avoir lieu. L'ARNP II se retrouverait ainsi éjectée de l'ADN avec le fragment excisé puis dégradée par le protéasome.

Enfin, il faut noter qu'après irradiation aux rayons UV ou traitement par le cisplatine de cellules en culture, la plus grosse sous-unité de l'ARNP II devient ubiquitinylée (Bregman *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 2003). Cette ubiquitinylation est déficiente chez les cellules des patients CS. Il a donc été proposé que le mécanisme de dégradation de l'ARNP II par ubiquitinylation était important pour le mécanisme de TCR. Néanmoins, une étude récente a montré que, chez la levure, la dégradation de l'ARNP II n'est pas nécessaire au mécanisme de TCR (Woudstra *et al.*, 2002). De plus, l'ARNP II peut être ubiquitinylée en réponse à une lésion ou à un site de pause sur l'ADN (Lee *et al.*, 2002). Ces études confirmeraient notre modèle dans lequel l'ARNP II se retrouve ubiquitinylée et dégradée si la réparation de la lésion bloquante ne peut se faire dans un délai raisonnable. RAD26 (l'homologue de CSB de levure) est associé à un facteur (DEF1) responsable de l'ubiquitinylation de l'ARNP II : il serait intéressant d'isoler l'homologue humain de ce facteur afin de comprendre le mécanisme d'ubiquitinylation de l'ARNP II dépendant de CSB (Woudstra *et al.*, 2002). Il serait également intéressant de savoir si l'ARNP II est ubiquitinylée avant ou après son éjection de l'ADN. Nos expériences montrent que l'éjection de l'ARNP II peut se faire sans ubiquitinylation de celle-ci (**publication 4**).

3. La microscopie et la biologie

Durant les dernières années, la microscopie s'est avérée être un outil précieux pour la compréhension des mécanismes moléculaires de la biologie. La biologie moléculaire a permis l'isolation de protéines et de complexes protéiques qui interviennent dans les divers processus impliquant l'ADN (réplication, réparation, transcription...). La compréhension de la fonction de ces complexes requiert l'analyse de leur structure tridimensionnelle ainsi que de leur mode de déplacement *in vivo*. Plusieurs techniques sont disponibles pour de telles études. Je décrirai dans cette section l'intérêt de l'utilisation de molécules fluorescentes, de la microscopie électronique et de la microscopie à force atomique (AFM) dans la biologie.

La découverte des protéines fluorescentes provenant d'organismes marins a permis de suivre le devenir des protéines au niveau cellulaire ou de l'organisme (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). La plus utilisée de ces protéines est la protéine fluorescente verte (GFP pour *green fluorescent protein*). L'utilisation de techniques d'inactivation par la lumière permet l'analyse de

la cinétique de la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP. Il est ainsi possible, grâce à la microscopie confocale, d'observer le déplacement des protéines *in vivo*. En inactivant, par la lumière, des protéines de la NER fusionnées à la GFP, l'équipe de Hoeijmakers a pu mieux définir le mode de fonctionnement de TFIIH, XPA et XPF/ERCC1 (Hoogstraten *et al.*, 2002 ; Houtsmuller *et al.*, 1999 ; Rademakers *et al.*, 2003). En effet, la réapparition de la fluorescence à l'endroit où le faisceau lumineux a été appliqué permet de déterminer la cinétique de diffusion des protéines étudiées. Ces études ont aussi montré que XPC reconnaissait la lésion et initiait l'assemblage séquentiel des protéines de la NER. Des études similaires se sont avérées utiles pour la compréhension de la dynamique de protéines cytoplasmiques et nucléaires telles que la MAPK, TBP et TFIIB (Chen *et al.*, 2002 ; van Drogen *et al.*, 2001). Ainsi la TBP resterait associée de façon stable sur les promoteurs des gènes afin de permettre plusieurs cycles de transcription successifs (Chen *et al.*, 2002).

La microscopie électronique s'est révélée cruciale pour la détermination de la structure tridimensionnelle de gros complexes macromoléculaires impliqués dans la transcription des gènes de classe II. Grâce à l'analyse d'images et à l'immunolocalisation, il a été possible de déterminer la structure de TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIH et l'ARNP II/TFIIF (Andel *et al.*, 1999 ; Brand *et al.*, 1999 ; Chung *et al.*, 2003 ; Leurent *et al.*, 2004 ; Schultz *et al.*, 2000) (voir section III.2). Ces études ont permis de mieux comprendre la fonction de ces complexes. En effet, TFIID se présente sous forme d'un complexe trilobé avec la TBP positionnée au milieu des lobes. TFIIA et TFIIB viennent se fixer sur 2 lobes opposés. TFIIF se retrouve tout autour de l'ARNP II confirmant son rôle dans l'enroulement de l'ADN autour de la polymérase lors de l'initiation de la transcription. La microscopie électronique est un bon moyen de détermination de la structure de gros complexes ne pouvant être résolue par cristallographie. La comparaison de la structure des facteurs homologues de levure et d'homme a également permis de confirmer la grande conservation de ces facteurs entre les eucaryotes supérieurs et inférieurs.

La microscopie à force atomique (AFM) présente l'avantage, par rapport à la microscopie électronique, de pouvoir analyser les protéines dans leur état fonctionnel en milieu aqueux, sans ajout d'agents extérieurs (Janicijevic *et al.*, 2003a). Il est donc possible de voir directement, par exemple, l'effet de la liaison d'une protéine sur l'ADN. Ces dernières années de grandes avancées ont été faites sur la structure de protéines de la réparation (Janicijevic *et al.*, 2003a). Chez la bactérie, la reconnaissance de la lésion, lors de la NER, est effectuée par UvrB. L'AFM a

révéle que l'ADN s'enroulait autour de UvrB lors de cette étape, ce qui pourrait permettre ensuite l'incision asymétrique de la lésion (Verhoeven *et al.*, 2001). De plus, ces techniques ont résolu un dilemme en montrant que 2 molécules de UvrB étaient impliquées dans la reconnaissance de la lésion et qu'une de ces molécules était éjectée après l'arrivée de UvrC (Verhoeven *et al.*, 2002). Contrairement à UvrB, XPC-hHR23B, le complexe de reconnaissance de la lésion chez l'homme, ne s'enroule pas autour de l'ADN. En effet, la structure de ce complexe, fixé sur une lésion, a été analysée par AFM : la fixation de XPC-hHR23B sur la lésion induit une torsion de l'ADN de 39° probablement nécessaire à la formation d'un complexe de réparation actif (Janicijevic *et al.*, 2003b). Enfin, l'AFM a permis de montrer que la protéine de Werner, mutée dans le syndrome du même nom, forme un hexamère sous sa forme active et possède une activité endonucléase (Xue *et al.*, 2002).

Les exemples cités ci dessus montrent l'importance de la combinaison de techniques de biologie moléculaire et de physique. Il sera certainement possible, dans un futur plus ou moins proche, de suivre au niveau cellulaire des réactions aussi compliquées que la transcription et la réparation de l'ADN.

REFERENCES

REFERENCES

- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, **80**, 859-868.
- Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kedinger, C. and Vigneron, M. (1997) Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J Biol Chem*, **272**, 16815-16821.
- Adamczewski, J.P., Rossignol, M., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Moncollin, V. and Egly, J.M. (1996) MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *Embo J*, **15**, 1877-1884.
- Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. and Stark, G.R. (1998) The p53 network. *J Biol Chem*, **273**, 1-4.
- Akoulitchev, S., Makela, T.P., Weinberg, R.A. and Reinberg, D. (1995) Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, **377**, 557-560.
- Akoulitchev, S. and Reinberg, D. (1998) The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIIH is mediated by phosphorylation of CDK7. *Genes Dev*, **12**, 3541-3550.
- Andel, F., 3rd, Ladurner, A.G., Inouye, C., Tjian, R. and Nogales, E. (1999) Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex. *Science*, **286**, 2153-2156.
- Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J.R., Wurtz, J.M., Ripp, R., Thierry, J.C., Egly, J.M. and Moras, D. (1997) The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *Embo J*, **16**, 958-967.
- Andersen, G., Poterszman, A., Egly, J.M., Moras, D. and Thierry, J.C. (1996) The crystal structure of human cyclin H. *FEBS Lett*, **397**, 65-69.
- Araujo, S.J., Nigg, E.A. and Wood, R.D. (2001) Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol*, **21**, 2281-2291.
- Araujo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaoja, J.E., Stucki, M., Hubscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (2000) Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev*, **14**, 349-359.
- Arellano, M. and Moreno, S. (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 559-573.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C.G., Lane, W.S., Thorner, J. and Hahn, S. (1994) Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev*, **8**, 1920-1934.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J.M., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. (2000) TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem*, **275**, 21896-21904.
- Batty, D.P. and Wood, R.D. (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, **241**, 193-204.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M. and Reinberg, D. (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*, **301**, 1090-1093.
- Bergmann, E. and Egly, J.M. (2001) Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends Genet*, **17**, 279-286.
- Berk, A.J. (2000) TBP-like factors come into focus. *Cell*, **103**, 5-8.
- Bertos, N.R., Wang, A.H. and Yang, X.J. (2001) Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol*, **79**, 243-252.

- Birse, C.E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B.A., Keller, W. and Proudfoot, N.J. (1998) Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science*, **280**, 298-301.
- Blau, J., Xiao, H., McCracken, S., O'Hare, P., Greenblatt, J. and Bentley, D. (1996) Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol*, **16**, 2044-2055.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. and Hanawalt, P.C. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**, 359-369.
- Botta, E., Nardo, T., Lehmann, A.R., Egly, J.M., Pedrini, A.M. and Stefanini, M. (2002) Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet*, **11**, 2919-2928.
- Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J.L., Grummt, I. and Egly, J.M. (2002) CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell*, **10**, 819-829.
- Bradsher, J., Coin, F. and Egly, J.M. (2000) Distinct roles for the helicases of TFIIH in transcript initiation and promoter escape. *J Biol Chem*, **275**, 2532-2538.
- Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L. and Schultz, P. (1999) Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFIIIC. *Science*, **286**, 2151-2153.
- Brand, M., Moggs, J.G., Oulad-Abdelghani, M., Lejeune, F., Dilworth, F.J., Stevenin, J., Almouzni, G. and Tora, L. (2001) UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J*, **20**, 3187-3196.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 349-383.
- Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C. and Warren, S.L. (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11586-11590.
- Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L. and Workman, J.L. (2000) The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci*, **25**, 15-19.
- Brown, S.A., Weirich, C.S., Newton, E.M. and Kingston, R.E. (1998) Transcriptional activation domains stimulate initiation and elongation at different times and via different residues. *Embo J*, **17**, 3146-3154.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84**, 843-851.
- Burglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Burlet, P., Munnich, A., Pequignot, E.V., Egly, J.M. and Melki, J. (1997) The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet*, **60**, 72-79.
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*, **10**, 711-724.
- Burley, S.K. and Roeder, R.G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*, **65**, 769-799.
- Bushnell, D.A., Cramer, P. and Kornberg, R.D. (2002) Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1218-1222.
- Busso, D., Keriél, A., Sandrocz, B., Poterszman, A., Gileadi, O. and Egly, J.M. (2000) Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIH transcription activities. *J Biol Chem*, **275**, 22815-22823.
- Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*, **16**, 2583-2592.
- Caruthers, J.M. and McKay, D.B. (2002) Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 123-133.
- Chang, W.H. and Kornberg, R.D. (2000) Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIIH. *Cell*, **102**, 609-613.
- Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. and Young, R.A. (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **380**, 82-85.
- Chen, D., Hinkley, C.S., Henry, R.W. and Huang, S. (2002) TBP dynamics in living human cells: constitutive association of TBP with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, **13**, 276-284.
- Chen, J., Larochelle, S., Li, X. and Suter, B. (2003) Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature*, **424**, 228-232.

- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, **5**, 905-915.
- Choder, M. and Young, R.A. (1993) A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol*, **13**, 6984-6991.
- Choi, C.H., Hiromura, M. and Usheva, A. (2003) Transcription factor IIB acetylates itself to regulate transcription. *Nature*, **424**, 965-969.
- Christians, F.C. and Hanawalt, P.C. (1992) Inhibition of transcription and strand-specific DNA repair by alpha-amanitin in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, **274**, 93-101.
- Chung, W.H., Craighead, J.L., Chang, W.H., Ezeokkonko, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R.D. and Asturias, F.J. (2003) RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell*, **12**, 1003-1013.
- Cismowski, M.J., Laff, G.M., Solomon, M.J. and Reed, S.I. (1995) KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol*, **15**, 2983-2992.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W. (2000) ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol*, **20**, 7643-7653.
- Clarkson, S.G. (2003) The XPG story. *Biochimie*, **85**, 1113-1121.
- Cleaver, J.E., Thompson, L.H., Richardson, A.S. and States, J.C. (1999) A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *Hum Mutat*, **14**, 9-22.
- Coin, F. and Egly, J.M. (1998) Ten years of TFIIH. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 105-110.
- Coin, F., Marinoni, J.C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M. and Egly, J.M. (1998) Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*, **20**, 184-188.
- Colella, S., Nardo, T., Botta, E., Lehmann, A.R. and Stefanini, M. (2000) Identical mutations in the CSB gene associated with either Cockayne syndrome or the DeSanctis-cacchione variant of xeroderma pigmentosum. *Hum Mol Genet*, **9**, 1171-1175.
- Coleman, R.A. and Pugh, B.F. (1997) Slow dimer dissociation of the TATA binding protein dictates the kinetics of DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7221-7226.
- Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1989) A multisubunit transcription factor essential for accurate initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **264**, 2357-2362.
- Cooper, P.K., Nospikel, T., Clarkson, S.G. and Leadon, S.A. (1997) Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science*, **275**, 990-993.
- Costa, R.M., Chigancas, V., da Silva Galhardo, R., Carvalho, H. and Menck, C.F. (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, **85**, 1083-1099.
- Cramer, P. (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 89-97.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. and Kornberg, R.D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **288**, 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.
- Dantonel, J.C., Murthy, K.G., Manley, J.L. and Tora, L. (1997) Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature*, **389**, 399-402.
- Davie, J.R. and Murphy, L.C. (1990) Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription. *Biochemistry*, **29**, 4752-4757.
- de Boer, J., Andressoo, J.O., de Wit, J., Huijman, J., Beems, R.B., van Steeg, H., Weeda, G., van der Horst, G.T., van Leeuwen, W., Themmen, A.P., Meradji, M. and Hoeijmakers, J.H. (2002) Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science*, **296**, 1276-1279.
- de Boer, J., de Wit, J., van Steeg, H., Berg, R.J., Morreau, H., Visser, P., Lehmann, A.R., Duran, M., Hoeijmakers, J.H. and Weeda, G. (1998) A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. *Mol Cell*, **1**, 981-990.

- de Boer, J. and Hoeijmakers, J.H. (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21**, 453-460.
- De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A. and Sassone-Corsi, P. (1998) Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12202-12207.
- de Laat, W.L., Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H. (1998) DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev*, **12**, 2598-2609.
- Deschavanne, P.J. and Harosh, I. (1993) The Rad3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA and DNA:RNA helicase with putative RNA helicase activity. *Mol Microbiol*, **7**, 831-835.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Dilworth, F.J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K. and Chambon, P. (2000) ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro. *Mol Cell*, **6**, 1049-1058.
- DiRenzo, J., Shang, Y., Phelan, M., Sif, S., Myers, M., Kingston, R. and Brown, M. (2000) BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol Cell Biol*, **20**, 7541-7549.
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lager, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E. and Seiser, C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol*, **19**, 5504-5511.
- Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D. and Hanawalt, P.C. (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8502-8506.
- Drapkin, R., Le Roy, G., Cho, H., Akoulitchev, S. and Reinberg, D. (1996) Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6488-6493.
- Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Bienstock, R.J., Keriell, A., Stefanini, M., Van Houten, B. and Egly, J.M. (2003) Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. *Mol Cell*, **11**, 1635-1646.
- Dvir, A., Tan, S., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1997) Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter. *J Biol Chem*, **272**, 28175-28178.
- Dye, M.J. and Proudfoot, N.J. (2001) Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell*, **105**, 669-681.
- Eberharter, A., Sterner, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., 3rd, Berger, S.L. and Workman, J.L. (1999) The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6621-6631.
- Eisen, J.A., Sweder, K.S. and Hanawalt, P.C. (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2715-2723.
- Elmendorf, B.J., Shilatfard, A., Yan, Q., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (2001) Transcription factors TFIIF, ELL, and Elongin negatively regulate SII-induced nascent transcript cleavage by non-arrested RNA polymerase II elongation intermediates. *J Biol Chem*, **276**, 23109-23114.
- Emami, K.H., Jain, A. and Smale, S.T. (1997) Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev*, **11**, 3007-3019.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1997) Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J*, **16**, 6559-6573.
- Feaver, W.J., Gileadi, O. and Kornberg, R.D. (1991) Purification and characterization of yeast RNA polymerase II transcription factor b. *J Biol Chem*, **266**, 19000-19005.
- Feaver, W.J., Henry, N.L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Bushnell, D.A., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1997) Genes for Tfb2, Tfb3, and Tfb4 subunits of yeast transcription/repair factor IIH. Homology to human cyclin-dependent kinase activating kinase and IIH subunits. *J Biol Chem*, **272**, 19319-19327.

- Feaver, W.J., Huang, W. and Friedberg, E.C. (1999) The TFB4 subunit of yeast TFIID is required for both nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*, **274**, 29564-29567.
- Feaver, W.J., Huang, W., Gileadi, O., Myers, L., Gustafsson, C.M., Kornberg, R.D. and Friedberg, E.C. (2000) Subunit interactions in yeast transcription/repair factor TFIID. Requirement for Tfb3 subunit in nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, **275**, 5941-5946.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1993) Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell*, **75**, 1379-1387.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L. and Kornberg, R.D. (1994) Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIID/TFIIDK. *Cell*, **79**, 1103-1109.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Fesquet, D., Morin, N., Doree, M. and Devault, A. (1997) Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling *Xenopus* egg extracts? *Oncogene*, **15**, 1303-1307.
- Fischer, L., Gerard, M., Chalut, C., Lutz, Y., Humbert, S., Kanno, M., Chambon, P. and Egly, J.M. (1992) Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2. *Science*, **257**, 1392-1395.
- Fribourg, S., Kellenberger, E., Rogniaux, H., Poterszman, A., Van Dorsselaer, A., Thierry, J.C., Egly, J.M., Moras, D. and Kieffer, B. (2000) Structural characterization of the cysteine-rich domain of TFIID p44 subunit. *J Biol Chem*, **275**, 31963-31971.
- Friedberg, E.C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
- Frit, P., Kwon, K., Coin, F., Auriol, J., Dubaele, S., Salles, B. and Egly, J.M. (2002) Transcriptional activators stimulate DNA repair. *Mol Cell*, **10**, 1391-1401.
- Gale, J.M., Nissen, K.A. and Smerdon, M.J. (1987) UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6644-6648.
- Garber, M.E. and Jones, K.A. (1999) HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol*, **11**, 460-465.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. and Ausio, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem*, **270**, 17923-17928.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P. and Egly, J.M. (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J Biol Chem*, **266**, 20940-20945.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H. and Tjian, R. (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 192-196.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, **292**, 1876-1882.
- Goldsborough, A.S. and Kornberg, T.B. (1996) Reduction of transcription by homologue asynapsis in *Drosophila* imaginal discs. *Nature*, **381**, 807-810.
- Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. and Meisterernst, M. (1996) A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *Embo J*, **15**, 3105-3116.
- Grant, P.A. and Berger, S.L. (1999) Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 169-177.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M. and Workman, J.L. (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem*, **274**, 5895-5900.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R., 3rd and Workman, J.L. (1998) A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, **94**, 45-53.
- Grummt, I. (1999) Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **62**, 109-154.
- Gu, W. and Reines, D. (1995) Identification of a decay in transcription potential that results in elongation factor dependence of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **270**, 11238-11244.
- Guzder, S.N., Sung, P., Bailly, V., Prakash, L. and Prakash, S. (1994) RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature*, **369**, 578-581.

- Guzman, E. and Lis, J.T. (1999) Transcription factor TFIIF is required for promoter melting in vivo. *Mol Cell Biol*, **19**, 5652-5658.
- Ha, I., Roberts, S., Maldonado, E., Sun, X., Kim, L.U., Green, M. and Reinberg, D. (1993) Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev*, **7**, 1021-1032.
- Haile, D.T. and Parvin, J.D. (1999) Activation of transcription in vitro by the BRCA1 carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem*, **274**, 2113-2117.
- Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 465-503.
- Hampsey, M. and Reinberg, D. (2003) Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell*, **113**, 429-432.
- Hara, R. and Sancar, A. (2002) The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle. *Mol Cell Biol*, **22**, 6779-6787.
- Hara, R., Selby, C.P., Liu, M., Price, D.H. and Sancar, A. (1999) Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerases I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer. *J Biol Chem*, **274**, 24779-24786.
- Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M. and Tora, L. (2002) TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation. *J Biol Chem*, **277**, 32875-32882.
- Harrison, S.C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, **353**, 715-719.
- Hasan, S., Hassa, P.O., Imhof, R. and Hottiger, M.O. (2001) Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature*, **410**, 387-391.
- Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L. and Ayer, D.E. (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell*, **89**, 341-347.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J*, **7**, 1395-1402.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S. and Young, R.A. (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, **2**, 43-53.
- Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S. and Young, R.A. (1995) Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev*, **9**, 897-910.
- Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L.D., Reagan, M.S., Legerski, R., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Mayne, L.V. et al. (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell*, **82**, 555-564.
- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D. and Winston, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 2288-2298.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-374.
- Holstege, F.C., Fiedler, U. and Timmers, H.T. (1997) Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J*, **16**, 7468-7480.
- Holstege, F.C. and Timmers, H.T. (1997) Analysis of open complex formation during RNA polymerase II transcription initiation using heteroduplex templates and potassium permanganate probing. *Methods*, **12**, 203-211.
- Holstege, F.C., van der Vliet, P.C. and Timmers, H.T. (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIF. *Embo J*, **15**, 1666-1677.
- Hoogstraten, D., Nigg, A.L., Heath, H., Mullenders, L.H., van Driel, R., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W. and Houtsmuller, A.B. (2002) Rapid switching of TFIIF between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Mol Cell*, **10**, 1163-1174.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W. (1999) Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, **284**, 958-961.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Sung, C.M., Liu, R. and Winkler, J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem*, **275**, 15254-15264.

- Hudson, B.P., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2000) Solution structure and acetyllysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J Mol Biol*, **304**, 355-370.
- Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J.H., Egly, J.M. and Moncollin, V. (1994) p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *Embo J*, **13**, 2393-2398.
- Hwang, J.R., Moncollin, V., Vermeulen, W., Seroz, T., van Vuuren, H., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1996) A 3' → 5' XPB helicase defect in repair/transcription factor TFIIH of xeroderma pigmentosum group B affects both DNA repair and transcription. *J Biol Chem*, **271**, 15898-15904.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J.M. and Grummt, I. (2002) TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell*, **109**, 297-306.
- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *J Cell Sci*, **109**, 1427-1436.
- Imbalzano, A.N., Zaret, K.S. and Kingston, R.E. (1994) Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem*, **269**, 8280-8286.
- Iyer, N., Reagan, M.S., Wu, K.J., Canagarajah, B. and Friedberg, E.C. (1996) Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*, **35**, 2157-2167.
- Izban, M.G. and Luse, D.S. (1992) Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J Biol Chem*, **267**, 13647-13655.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P. and Tora, L. (1994) Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, **79**, 107-117.
- Janicijevic, A., Ristic, D. and Wyman, C. (2003a) The molecular machines of DNA repair: scanning force microscopy analysis of their architecture. *J Microsc*, **212**, 264-272.
- Janicijevic, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J.H. and Wyman, C. (2003b) DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 325-336.
- Jawhari, A., Laine, J.P., Dubaele, S., Lamour, V., Poterszman, A., Coin, F., Moras, D. and Egly, J.M. (2002) p52 Mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. *J Biol Chem*, **277**, 31761-31767.
- Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science*, **283**, 1001-1004.
- Kang, M.E. and Dahmus, M.E. (1993) RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter. *J Biol Chem*, **268**, 25033-25040.
- Keaveney, M. and Struhl, K. (1998) Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell*, **1**, 917-924.
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C. and Egly, J.M. (2002) XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell*, **109**, 125-135.
- Kim, J.B. and Sharp, P.A. (2001) Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem*, **276**, 12317-12323.
- Kim, J.K., Patel, D. and Choi, B.S. (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol*, **62**, 44-50.
- Kim, S., Cabane, K., Hampsey, M. and Reinberg, D. (2000a) Genetic analysis of the YDR1-BUR6 repressor complex reveals an intricate balance among transcriptional regulatory proteins in yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 2455-2465.
- Kim, T.K., Ebright, R.H. and Reinberg, D. (2000b) Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIF. *Science*, **288**, 1418-1422.

- Kim, W.Y. and Dahmus, M.E. (1989) The major late promoter of adenovirus-2 is accurately transcribed by RNA polymerases IIO, IIA, and IIB. *J Biol Chem*, **264**, 3169-3176.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599-608.
- Kimura, H., Tao, Y., Roeder, R.G. and Cook, P.R. (1999) Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure. *Mol Cell Biol*, **19**, 5383-5392.
- Knoepfler, P.S. and Eisenman, R.N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell*, **99**, 447-450.
- Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-1072.
- Ko, L.J., Shieh, S.Y., Chen, X., Jayaraman, L., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C. and Pan, Z.Q. (1997) p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner. *Mol Cell Biol*, **17**, 7220-7229.
- Kobor, M.S., Simon, L.D., Omichinski, J., Zhong, G., Archambault, J. and Greenblatt, J. (2000) A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **20**, 7438-7449.
- Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, **368**, 466-469.
- Komissarova, N. and Kashlev, M. (1997) RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*, **272**, 15329-15338.
- Koshland, D. and Strunnikov, A. (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 305-333.
- Kraemer, K.H., Lee, M.M. and Scotto, J. (1987) Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol*, **123**, 241-250.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, **383**, 269-272.
- Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J. and Akoulitchev, A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol*, **9**, 800-805.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebright, R.H. (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, **12**, 34-44.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R.P., Salz, H.K. and Suter, B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev*, **12**, 370-381.
- Le Page, F., Kwok, E.E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S.A., Sarasin, A. and Cooper, P.K. (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIF, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell*, **101**, 159-171.
- Leclerc, V., Raisin, S. and Leopold, P. (2000) Dominant-negative mutants reveal a role for the Cdk7 kinase at the mid-blastula transition in *Drosophila* embryos. *Embo J*, **19**, 1567-1575.
- Lee, K.B., Wang, D., Lippard, S.J. and Sharp, P.A. (2002) Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4239-4244.
- Lee, S.K., Yu, S.L., Prakash, L. and Prakash, S. (2001) Requirement for yeast RAD26, a homolog of the human CSB gene, in elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **21**, 8651-8656.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. and Young, R.A. (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*, **18**, 4455-4462.
- Lee, T.I. and Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, **34**, 77-137.
- Lehmann, A.R. (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, **85**, 1101-1111.
- Lei, L., Ren, D. and Burton, Z.F. (1999) The RAP74 subunit of human transcription factor IIF has similar roles in initiation and elongation. *Mol Cell Biol*, **19**, 8372-8382.

- Lemon, B. and Tjian, R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, **14**, 2551-2569.
- Leurent, C., Sanders, S.L., Demeny, M.A., Garbett, K.A., Ruhlmann, C., Weil, P.A., Tora, L. and Schultz, P. (2004) Mapping key functional sites within yeast TFIID. *Embo J*.
- Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J.M. and Wasylyk, B. (1996) Functional interactions between p53 and the TFIID complex are affected by tumour-associated mutations. *Embo J*, **15**, 1615-1624.
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, **3**, 662-673.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D. (1997) DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 158-169.
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson, G.H. (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol*, **Suppl**, S7-14.
- Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X.W., Conaway, J.W., Harris, C.C., Conaway, R.C., Reinberg, D. and Levens, D. (2001a) Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell*, **104**, 353-363.
- Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J.M. and Levens, D. (2000a) The FBP interacting repressor targets TFIID to inhibit activated transcription. *Mol Cell*, **5**, 331-341.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **19**, 1202-1209.
- Liu, M., Xie, Z. and Price, D.H. (1998) A human RNA polymerase II transcription termination factor is a SWI2/SNF2 family member. *J Biol Chem*, **273**, 25541-25544.
- Liu, X., Mann, D.B., Suquet, C., Springer, D.L. and Smerdon, M.J. (2000b) Ultraviolet damage and nucleosome folding of the 5S ribosomal RNA gene. *Biochemistry*, **39**, 557-566.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2001b) Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12426-12431.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, **5**, 917-926.
- Long, J.J., Leresche, A., Kriwacki, R.W. and Gottesfeld, J.M. (1998) Repression of TFIID transcriptional activity and TFIID-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol Cell Biol*, **18**, 1467-1476.
- Lu, H., Fisher, R.P., Bailey, P. and Levine, A.J. (1997) The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IID phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol Cell Biol*, **17**, 5923-5934.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.M. and Reinberg, D. (1992) Human general transcription factor IID phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature*, **358**, 641-645.
- Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, **25**, 1192-1200.
- Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L. and Stallcup, M.R. (2001) Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol*, **11**, 1981-1985.
- Ma, L., Siemssen, E.D., Noteborn, H.M. and van der Eb, A.J. (1994a) The xeroderma pigmentosum group B protein ERCC3 produced in the baculovirus system exhibits DNA helicase activity. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4095-4102.
- Ma, L., Westbroek, A., Jochemsen, A.G., Weeda, G., Bosch, A., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. and van der Eb, A.J. (1994b) Mutational analysis of ERCC3, which is involved in DNA repair and transcription initiation: identification of domains essential for the DNA repair function. *Mol Cell Biol*, **14**, 4126-4134.
- Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**, 254-257.

- Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. and Reinberg, D. (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, **381**, 86-89.
- Marinoni, J.C., Roy, R., Vermeulen, W., Miniou, P., Lutz, Y., Weeda, G., Seroz, T., Gomez, D.M., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1997) Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TFIIH. *Embo J*, **16**, 1093-1102.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z. and Price, D.H. (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem*, **271**, 27176-27183.
- Marshall, N.F. and Price, D.H. (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem*, **270**, 12335-12338.
- Matsui, P., DePaulo, J. and Buratowski, S. (1995) An interaction between the Tfb1 and Ssl1 subunits of yeast TFIIH correlates with DNA repair activity. *Nucleic Acids Res*, **23**, 767-772.
- Maxon, M.E., Goodrich, J.A. and Tjian, R. (1994) Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev*, **8**, 515-524.
- McKay, B.C., Chen, F., Clarke, S.T., Wiggin, H.E., Harley, L.M. and Ljungman, M. (2001) UV light-induced degradation of RNA polymerase II is dependent on the Cockayne's syndrome A and B proteins but not p53 or MLH1. *Mutat Res*, **485**, 93-105.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J. and Reinberg, D. (1993) DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**, 227-232.
- Metzger, D. and Chambon, P. (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*, **24**, 71-80.
- Mitchell, D.L., Nguyen, T.D. and Cleaver, J.E. (1990) Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J Biol Chem*, **265**, 5353-5356.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D. (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, **87**, 1261-1270.
- Moggs, J.G., Szymkowski, D.E., Yamada, M., Karran, P. and Wood, R.D. (1997) Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, **25**, 480-491.
- Moreland, R.J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J.W., Egly, J.M. and Conaway, R.C. (1999) A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **274**, 22127-22130.
- Morris, J.R., Chen, J.L., Geyer, P.K. and Wu, C.T. (1998) Two modes of transvection: enhancer action in trans and bypass of a chromatin insulator in cis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10740-10745.
- Mu, D., Hsu, D.S. and Sancar, A. (1996) Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*, **271**, 8285-8294.
- Mu, D., Park, C.H., Matsunaga, T., Hsu, D.S., Reardon, J.T. and Sancar, A. (1995) Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem*, **270**, 2415-2418.
- Mu, D. and Sancar, A. (1997) Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J Biol Chem*, **272**, 7570-7573.
- Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D.S. and Sancar, A. (1997) Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem*, **272**, 28971-28979.
- Naar, A.M., Lemon, B.D. and Tjian, R. (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*, **70**, 475-501.
- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L. and Workman, J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol*, **22**, 1615-1625.
- Ng, J.M., Vermeulen, W., van der Horst, G.T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H. and Hoeijmakers, J.H. (2003) A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev*, **17**, 1630-1645.
- Nigg, E.A. (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 312-317.
- Nikolov, D.B. and Burley, S.K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 15-22.

- Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Hoffman, A., Roeder, R.G. and Burley, S.K. (1996) Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4862-4867.
- O'Shea-Greenfield, A. and Smale, S.T. (1992) Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*, **267**, 1391-1402.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J. and Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, **94**, 35-44.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.
- Ohkuma, Y. and Roeder, R.G. (1994) Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature*, **368**, 160-163.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **10**, 2657-2683.
- Osheim, Y.N., Proudfoot, N.J. and Beyer, A.L. (1999) EM visualization of transcription by RNA polymerase II: downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage. *Mol Cell*, **3**, 379-387.
- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A.M., Gustafsson, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, **3**, 109-118.
- Park, J.S., Marr, M.T. and Roberts, J.W. (2002) E. coli Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell*, **109**, 757-767.
- Pastoriza Gallego, M. and Sarasin, A. (2003) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. *Biochimie*, **85**, 1073-1082.
- Paule, M.R. and White, R.J. (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1283-1298.
- Perez, C., Auriol, J., Seroz, T. and Egly, J.M. (1998) Genomic organization and promoter characterization of the mouse and human genes encoding p62 subunit of the transcription/DNA repair factor TFIIF. *Gene*, **213**, 73-82.
- Pham, A.D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science*, **289**, 2357-2360.
- Pinto, I., Wu, W.H., Na, J.G. and Hampsey, M. (1994) Characterization of sua7 mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. *J Biol Chem*, **269**, 30569-30573.
- Poon, R.Y., Yamashita, K., Howell, M., Ershler, M.A., Belyavsky, A. and Hunt, T. (1994) Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15. *J Cell Sci*, **107**, 2789-2799.
- Prigent, C., Satoh, M.S., Daly, G., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1994) Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. *Mol Cell Biol*, **14**, 310-317.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501-512.
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-689.
- Ptashne, M. and Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, **386**, 569-577.
- Qadri, I., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Schaack, J. and Siddiqui, A. (1996) Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIF and stimulates the DNA helicase activity of TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10578-10583.
- Rabenstein, M.D., Zhou, S., Lis, J.T. and Tjian, R. (1999) TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4791-4796.
- Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A.L., Mone, M.J., Van Zeeland, A.A., Hoeijmakers, J.H., Houtsmuller, A.B. and Vermeulen, W. (2003) Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Mol Cell Biol*, **23**, 5755-5767.
- Ramanathan, B. and Smerdon, M.J. (1989) Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J Biol Chem*, **264**, 11026-11034.
- Rapin, I., Lindenbaum, Y., Dickson, D.W., Kraemer, K.H. and Robbins, J.H. (2000) Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology*, **55**, 1442-1449.

- Ratner, J.N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S.L. and Bregman, D.B. (1998) Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*, **273**, 5184-5189.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H. and Sancar, A. (1997) In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9463-9468.
- Reardon, J.T., Ge, H., Gibbs, E., Sancar, A., Hurwitz, J. and Pan, Z.Q. (1996) Isolation and characterization of two human transcription factor IIH (TFIIH)-related complexes: ERCC2/CAK and TFIIH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6482-6487.
- Reines, D. (1992) Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **267**, 3795-3800.
- Riboni, R., Botta, E., Stefanini, M., Numata, M. and Yasui, A. (1992) Identification of the eleventh complementation group of UV-sensitive excision repair-defective rodent mutants. *Cancer Res*, **52**, 6690-6691.
- Riedl, T. and Egly, J.M. (2000) Phosphorylation in transcription: the CTD and more. *Gene Expr*, **9**, 3-13.
- Riedl, T., Hanaoka, F. and Egly, J.M. (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J*, **22**, 5293-5303.
- Robbins, J.H., Kraemer, K.H., Lutzner, M.A., Festoff, B.W. and Coon, H.G. (1974) Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. *Ann Intern Med*, **80**, 221-248.
- Robert, F., Douziech, M., Forget, D., Egly, J.M., Greenblatt, J., Burton, Z.F. and Coulombe, B. (1998) Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIIF. *Mol Cell*, **2**, 341-351.
- Robzyk, K., Recht, J. and Osley, M.A. (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, **287**, 501-504.
- Rockx, D.A., Mason, R., van Hoffen, A., Barton, M.C., Citterio, E., Bregman, D.B., van Zeeland, A.A., Vrieling, H. and Mullenders, L.H. (2000) UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10503-10508.
- Rossi, D.J., Londesborough, A., Korsisaari, N., Pihlak, A., Lehtonen, E., Henkemeyer, M. and Makela, T.P. (2001) Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking Mat1. *Embo J*, **20**, 2844-2856.
- Rossignol, M., Keriél, A., Staub, A. and Egly, J.M. (1999) Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIIF transcription factor. *J Biol Chem*, **274**, 22387-22392.
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I. and Egly, J.M. (1997) Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH. *Embo J*, **16**, 1628-1637.
- Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 81-120.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.P., Schaeffer, L., Nigg, E.A., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell*, **79**, 1093-1101.
- Rudd, M.D., Izban, M.G. and Luse, D.S. (1994) The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8057-8061.
- Sands, A.T., Abuin, A., Sanchez, A., Conti, C.J. and Bradley, A. (1995) High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature*, **377**, 162-165.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. and Allis, C.D. (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, **285**, 886-891.
- Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J*, **13**, 2388-2392.

- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Chambon, P. and Egly, J.M. (1993) DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, **260**, 58-63.
- Schneider, E., Montenarh, M. and Wagner, P. (1998) Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene*, **17**, 2733-2741.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D. and Egly, J.M. (2000) Molecular structure of human TFIIH. *Cell*, **102**, 599-607.
- Selby, C.P., Drapkin, R., Reinberg, D. and Sancar, A. (1997) RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair. *Nucleic Acids Res*, **25**, 787-793.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science*, **260**, 53-58.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1997a) Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11205-11209.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1997b) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **272**, 1885-1890.
- Seroz, T., Perez, C., Bergmann, E., Bradsher, J. and Egly, J.M. (2000) p44/SSL1, the regulatory subunit of the XPD/RAD3 helicase, plays a crucial role in the transcriptional activity of TFIIH. *J Biol Chem*, **275**, 33260-33266.
- Shilatifard, A., Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (2003) The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem*, **72**, 693-715.
- Shivji, M.K., Moggs, J.G., Kuraoka, I. and Wood, R.D. (1999) Dual-incision assays for nucleotide excision repair using DNA with a lesion at a specific site. *Methods Mol Biol*, **113**, 373-392.
- Shivji, M.K., Podust, V.N., Hubscher, U. and Wood, R.D. (1995) Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry*, **34**, 5011-5017.
- Shuttleworth, J., Godfrey, R. and Colman, A. (1990) p40MO15, a cdc2-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J*, **9**, 3233-3240.
- Sidorenkov, I., Komissarova, N. and Kashlev, M. (1998) Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, **2**, 55-64.
- Sil, A.K., Alam, S., Xin, P., Ma, L., Morgan, M., Lebo, C.M., Woods, M.P. and Hopper, J.E. (1999) The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Mol Cell Biol*, **19**, 7828-7840.
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, **72**, 449-479.
- Spangler, L., Wang, X., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Dvir, A. (2001) TFIIH action in transcription initiation and promoter escape requires distinct regions of downstream promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5544-5549.
- Spencer, V.A. and Davie, J.R. (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, **240**, 1-12.
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*, **12**, 599-606.
- Struhl, K., Kadosh, D., Keaveney, M., Kuras, L. and Moqtaderi, Z. (1998) Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 413-421.
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3364-3369.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, **2**, 223-232.
- Sung, P., Bailly, V., Weber, C., Thompson, L.H., Prakash, L. and Prakash, S. (1993) Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature*, **365**, 852-855.
- Sung, P., Guzder, S.N., Prakash, L. and Prakash, S. (1996) Reconstitution of TFIIH and requirement of its DNA helicase subunits, Rad3 and Rad25, in the incision step of nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, **271**, 10821-10826.

- Sung, P., Higgins, D., Prakash, L. and Prakash, S. (1988) Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *Embo J*, **7**, 3263-3269.
- Svejstrup, J.Q. (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 21-29.
- Svejstrup, J.Q. (2003) Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J Cell Sci*, **116**, 447-451.
- Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1995) Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell*, **80**, 21-28.
- Takagi, Y., Komori, H., Chang, W.H., Hudmon, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R.D. (2003) Revised subunit structure of yeast transcription factor IIH (TFIIH) and reconciliation with human TFIIH. *J Biol Chem*, **278**, 43897-43900.
- Talukder, A.H., Mishra, S.K., Mandal, M., Balasenthil, S., Mehta, S., Sahin, A.A., Barnes, C.J. and Kumar, R. (2003) MTA1 interacts with MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase complex ring finger factor, and regulates estrogen receptor transactivation functions. *J Biol Chem*, **278**, 11676-11685.
- Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1994) Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol*, **127**, 467-478.
- Taylor, E.M., Broughton, B.C., Botta, E., Stefanini, M., Sarasin, A., Jaspers, N.G., Fawcett, H., Harcourt, S.A., Arlett, C.F. and Lehmann, A.R. (1997) Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8658-8663.
- Thoma, F. (1999) Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *Embo J*, **18**, 6585-6598.
- Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J. and Mahadevan, L.C. (1999) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J*, **18**, 4779-4793.
- Thuret, J.Y., Valay, J.G., Faye, G. and Mann, C. (1996) Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell*, **86**, 565-576.
- Tijsterman, M., de Pril, R., Tasseront-de Jong, J.G. and Brouwer, J. (1999) RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 934-940.
- Timmers, H.T. (1994) Transcription initiation by RNA polymerase II does not require hydrolysis of the beta-gamma phosphoanhydride bond of ATP. *Embo J*, **13**, 391-399.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F. and Egly, J.M. (1999) Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell*, **3**, 87-95.
- Tornaletti, S., Patrick, S.M., Turchi, J.J. and Hanawalt, P.C. (2003) Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II at site-specific cisplatin adducts in the template DNA. *J Biol Chem*, **278**, 35791-35797.
- Tornaletti, S., Reines, D. and Hanawalt, P.C. (1999) Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J Biol Chem*, **274**, 24124-24130.
- Triezenberg, S.J. (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 190-196.
- Tsai, F.T. and Sigler, P.B. (2000) Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *Embo J*, **19**, 25-36.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J*, **13**, 3822-3831.
- Tu, Y., Tornaletti, S. and Pfeifer, G.P. (1996) DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *Embo J*, **15**, 675-683.
- Tudor, M., Murray, P.J., Onufryk, C., Jaenisch, R. and Young, R.A. (1999) Ubiquitous expression and embryonic requirement for RNA polymerase II coactivator subunit *Srb7* in mice. *Genes Dev*, **13**, 2365-2368.

- Uptain, S.M., Kane, C.M. and Chamberlin, M.J. (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*, **66**, 117-172.
- Ura, K., Araki, M., Saeki, H., Masutani, C., Ito, T., Iwai, S., Mizukoshi, T., Kaneda, Y. and Hanaoka, F. (2001) ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes. *Embo J*, **20**, 2004-2014.
- Ura, K. and Hayes, J.J. (2002) Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem*, **269**, 2288-2293.
- Usheva, A., Maldonado, E., Goldring, A., Lu, H., Houbavi, C., Reinberg, D. and Aloni, Y. (1992) Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell*, **69**, 871-881.
- Utley, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S. and Workman, J.L. (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, **394**, 498-502.
- Valay, J.G., Simon, M. and Faye, G. (1993) The kin28 protein kinase is associated with a cyclin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, **234**, 307-310.
- van der Horst, G.T., van Steeg, H., Berg, R.J., van Gool, A.J., de Wit, J., Weeda, G., Morreau, H., Beems, R.B., van Kreijl, C.F., de Gruijl, F.R., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1997) Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition. *Cell*, **89**, 425-435.
- van Drogen, F., Stucke, V.M., Jorritsma, G. and Peter, M. (2001) MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol*, **3**, 1051-1059.
- van Gool, A.J., Citterio, E., Rademakers, S., van Os, R., Vermeulen, W., Constantinou, A., Egly, J.M., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1997) The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *Embo J*, **16**, 5955-5965.
- Van Mullem, V., Wery, M., Werner, M., Vandenhoute, J. and Thuriaux, P. (2002) The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem*, **277**, 10220-10225.
- Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Mayne, L.V. (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4707-4711.
- Verhoeven, E.E., Wyman, C., Moolenaar, G.F. and Goosen, N. (2002) The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands. *Embo J*, **21**, 4196-4205.
- Verhoeven, E.E., Wyman, C., Moolenaar, G.F., Hoeijmakers, J.H. and Goosen, N. (2001) Architecture of nucleotide excision repair complexes: DNA is wrapped by UvrB before and after damage recognition. *Embo J*, **20**, 601-611.
- Vermeulen, W., Bergmann, E., Auriol, J., Rademakers, S., Frit, P., Appeldoorn, E., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (2000) Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat Genet*, **26**, 307-313.
- Vichi, P., Coin, F., Renaud, J.P., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Moras, D. and Egly, J.M. (1997) Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. *Embo J*, **16**, 7444-7456.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, **20**, 1899-1910.
- Vincent, A.C. and Struhl, K. (1992) ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol Cell Biol*, **12**, 5394-5405.
- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, **8**, 213-224.
- Wada, T., Orphanides, G., Hasegawa, J., Kim, D.K., Shima, D., Yamaguchi, Y., Fukuda, A., Hisatake, K., Oh, S., Reinberg, D. and Handa, H. (2000) FACT relieves DSIF/NELF-mediated inhibition of transcriptional elongation and reveals functional differences between P-TEFb and TFIIH. *Mol Cell*, **5**, 1067-1072.

- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., Buratowski, S. and Handa, H. (1998) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev*, **12**, 343-356.
- Wahi, M., Komachi, K. and Johnson, A.D. (1998) Gene regulation by the yeast Ssn6-Tup1 corepressor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 447-457.
- Walker, S.S., Shen, W.C., Reese, J.C., Apone, L.M. and Green, M.R. (1997) Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell*, **90**, 607-614.
- Walter, P.P., Owen-Hughes, T.A., Cote, J. and Workman, J.L. (1995) Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer. *Mol Cell Biol*, **15**, 6178-6187.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.
- Wang, X.W., Vermeulen, W., Coursen, J.D., Gibson, M., Lupold, S.E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J.H. and Harris, C.C. (1996) The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev*, **10**, 1219-1232.
- Wang, Z., Buratowski, S., Svejstrup, J.Q., Feaver, W.J., Wu, X., Kornberg, R.D., Donahue, T.F. and Friedberg, E.C. (1995) The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol*, **15**, 2288-2293.
- Wang, Z.G., Wu, X.H. and Friedberg, E.C. (1991) Nucleotide excision repair of DNA by human cell extracts is suppressed in reconstituted nucleosomes. *J Biol Chem*, **266**, 22472-22478.
- Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2001) Accuracy of lesion bypass by yeast and human DNA polymerase ϵ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8355-8360.
- Weber, C.A., Salazar, E.P., Stewart, S.A. and Thompson, L.H. (1990) ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *Embo J*, **9**, 1437-1447.
- Weeda, G., Hoeijmakers, J.H. and Bootsma, D. (1993) Genes controlling nucleotide excision repair in eukaryotic cells. *Bioessays*, **15**, 249-258.
- Weeda, G., van Ham, R.C., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A.J. and Hoeijmakers, J.H. (1990) A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell*, **62**, 777-791.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. and Tora, L. (1998) Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, **393**, 187-191.
- Winkler, G.S., Araujo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T. and Weeda, G. (2000) TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J Biol Chem*, **275**, 4258-4266.
- Winkler, G.S., Sugasawa, K., Eker, A.P., de Laat, W.L. and Hoeijmakers, J.H. (2001) Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry*, **40**, 160-165.
- Winkler, G.S., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H. and Weeda, G. (1998) Affinity purification of human DNA repair/transcription factor TFIIH using epitope-tagged xeroderma pigmentosum B protein. *J Biol Chem*, **273**, 1092-1098.
- Wold, M.S. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, **66**, 61-92.
- Wood, R.D. (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, **272**, 23465-23468.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*, **415**, 929-933.

- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J. et al. (1994) Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol*, **14**, 7013-7024.
- Xue, Y., Ratcliff, G.C., Wang, H., Davis-Searles, P.R., Gray, M.D., Erie, D.A. and Redinbo, M.R. (2002) A minimal exonuclease domain of WRN forms a hexamer on DNA and possesses both 3'- 5' exonuclease and 5'-protruding strand endonuclease activities. *Biochemistry*, **41**, 2901-2912.
- Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T. and Handa, H. (2002) Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol*, **22**, 2918-2927.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
- Yan, M. and Gralla, J.D. (1997) Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *Embo J*, **16**, 7457-7467.
- Yan, Q., Moreland, R.J., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1999) Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **274**, 35668-35675.
- Yang, L.Y., Jiang, H., Rangel, K.M. and Plunkett, W. (2003) Cisplatin-induced ubiquitination of RNA polymerase II large subunit and suppression of induction by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01). *Oncol Rep*, **10**, 1489-1495.
- Yankulov, K.Y. and Bentley, D.L. (1997) Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIID. *Embo J*, **16**, 1638-1646.
- Yoon, H., Miller, S.P., Pabich, E.K. and Donahue, T.F. (1992) SSL1, a suppressor of a HIS4 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast. *Genes Dev*, **6**, 2463-2477.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J. and O'Donnell, M. (1999) Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *Embo J*, **18**, 6189-6199.
- Zawel, L., Kumar, K.P. and Reinberg, D. (1995) Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*, **9**, 1479-1490.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1995) Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, **64**, 533-561.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1998) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell*, **1**, 1021-1031.
- Zlatanova, J., Leuba, S.H. and van Holde, K. (1998) Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J*, **74**, 2554-2566.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F. and Voellmy, R. (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, **94**, 471-480.
- Zurita, M. and Merino, C. (2003) The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet*, **19**, 578-584.

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

Frédéric Coin, Etienne Bergmann, **Alexandre Tremeau-Bravard**, and Jean-Marc Egly (1999). Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO J*, 18(5): 1357-1366.

Alexandre Tremeau-Bravard, Christophe Perez and Jean-Marc Egly (2001). A role of the C-terminal part of p44 in promoter escape activity of transcription factor TFIIH. *J Biol Chem*, 276(29): 27693-27697.

Grosse S, **Tremeau-Bravard A**, Aron Y, Briand P, and Fajac I (2002). Intracellular rate limiting steps of gene transfer using glycosylated polylysines in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Gene Therapy*, 9(15): 1000-1007.

Patrick Lin, **Alexandre Tremeau-Bravard** and Michael Dahmus (2003). The repetitive C-terminal domain of RNA polymerase II: multiple conformational states drive the transcription cycle. *Chem Rec*, 3(4): 235-245.

Alexandre Tremeau-Bravard*, Thilo Riedl*, Jean-Marc Egly and Michael Dahmus (2004)(*co-premiers auteurs). Fate of transcription complexes stalled on a cisplatin lesion during repair. *J Biol Chem*, 279(9): 7751-7759.

Benoît Palancade*, Nicholas Marshall*, **Alexandre Tremeau-Bravard**, Olivier Bensaude, Michael Dahmus and Marie-Françoise Dubois (2004)(*co-premiers auteurs). Dephosphorylation of RNA Polymerase II by CTD-phosphatase FCP1 is inhibited by phospho-CTD associating proteins. *J Mol Biol*, 335(2): 415-424.

RESUME

Etude fonctionnelle de TFIIH et des mécanismes de transcription et de réparation de l'ADN.

La régulation de l'expression des gènes et la réparation de l'ADN sont deux mécanismes essentiels à la survie de la cellule. La transcription des gènes de classe II codant pour les protéines est un mécanisme complexe faisant intervenir une myriade de protéines dont l'ARN polymérase II (ARNP II) et six facteurs généraux de la transcription (TFIIA, B, D, E, F et H). La réparation par excision de nucléotides (NER) permet l'élimination des lésions distordant l'ADN, c'est un mécanisme crucial pour le maintien de l'information génétique. Il fait également intervenir plus d'une vingtaine de protéines qui, pour certaines, se retrouvent mutées chez les patients atteints de maladies génétiques rares. Le facteur général de transcription TFIIH joue aussi un rôle dans l'étape d'ouverture de l'ADN autour de la lésion lors de la NER.

Au cours de mon travail doctoral, j'ai entrepris dans un premier temps de détailler le rôle intrinsèque des différentes sous-unités du facteur TFIIH, et plus particulièrement de la sous-unité p44. J'ai ainsi pu montrer que la partie carboxy-terminale de cette protéine jouait un rôle dans la cohésion du complexe TFIIH mais aussi dans son activité d'échappée du promoteur lors de l'initiation de la transcription. Puis, dans un second temps, je me suis intéressé au mécanisme reliant la transcription à la réparation, nommé transcription couplée à la réparation. J'ai ainsi pu montrer qu'une ARNP II bloquée par une lésion cisplatine sur le brin transcrit de l'ADN se retrouve éjectée de l'ADN de façon ATP mais non réparation dépendante.

SUMMARY

Functional study of TFIIH and the mechanisms of transcription and DNA repair.

Genes regulation and DNA repair are two processes vital to cell survival. Transcription of class II genes (mostly protein coding genes) is a complex process involving the functions of many proteins, among them the RNA polymerase II (RNAP II) and six general transcription factors (TFIIA, B, D, E, F and H). Nucleotide excision repair (NER) is a mechanism whereby DNA lesions are eliminated. It's a key mechanism for the maintenance of genetic information. More than twenty proteins participate in this reaction. Mutation in some of them give rise to DNA repair genetic disorders. The general transcription factor TFIIH plays also a role in DNA melting around the lesion during the NER reaction.

During my PhD study, I first study the role of different TFIIH subunits, especially the p44 subunit. I was able to show that the carboxy-terminal domain of this protein is important for TFIIH cohesion but also promoter escape activity of TFIIH. Then I focused my attention on the mechanism that link transcription and DNA repair: transcription coupled repair. I was able to show that an RNAP II blocked by a cisplatin lesion on the transcribed DNA strand is ejected from the template in an ATP but not a repair dependent manner.

Mots clefs: Transcription, réparation par excision de nucléotides, ARN polymérase II, TFIIH.

Discipline: Sciences du Vivant. **Spécialité**: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie.

Lieux de préparation de la thèse: Unité de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique (U 596 INSERM), IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France. Section of Molecular and Cellular Biology, University of California, 149 Briggs Hall, Davis, California 95616, USA.