

Thèse présentée par

Sara HARDY

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Sciences du Vivant – Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Etudes fonctionnelles des complexes multiprotéiques
contenant la protéine TRRAP**

**Implication de hTRRAP dans la réparation des cassures
double-brin de l'ADN**

Soutenue publiquement le 24 juin 2005

JURY :

- Directeur de Thèse : **Dr László Tora**, IGBMC, Illkirch
- Rapporteur interne : **Dr Régine Losson**, IGBMC, Illkirch
- Rapporteur externe : **Dr Geneviève Almouzni**, Institut Curie, Paris
- Rapporteur externe : **Dr Didier Trouche**, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes, Toulouse
- Examineur : **Pr Etienne Weiss**, ESBS, Illkirch





REMERCIEMENTS

Je remercie les Professeurs Pierre Chambon et Jean-Louis Mandel de m'avoir accueillie dans leur Institut, ce qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans des conditions matérielles et scientifiques tout à fait exceptionnelles.

Je remercie particulièrement le Docteur L.Tora de m'avoir intégrée à son équipe dès l'obtention de mon DEA, d'avoir accepté d'encadrer mon travail de recherche et de devenir mon directeur de thèse. Je remercie le Docteur L.Tora de ses conseils scientifiques avisés, de la confiance qu'il m'a témoignée et de l'intérêt soutenu qu'il a manifesté pour mon travail.

Je remercie les membres du jury, le Docteur Didier Trouche, le Docteur Geneviève Almouzni, le Docteur Régine Losson, et le professeur Etienne Weiss d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie particulièrement Flavie Robert et Dominique Helmlinger avec lesquels j'ai été en étroite collaboration durant mon travail de thèse, en ce qui concerne les travaux sur TRRAP et sur Ataxin 7, respectivement. Flavie, pour son dynamisme et ses discussions, Dominique pour sa passion de la recherche très communicative.

Je remercie également les collaborateurs externes à l'institut, l'équipe de Dora Papadopoulo à l'Institut Curie, notamment Céline Baldeyron et Céline Jacquemont, l'équipe de Herceg, Rabih Murr, l'équipe de S.Kato, J.Yanagisawa, l'équipe de M. Meisterernst, G.Mittler.

Je remercie tous les membres du laboratoire de L.Tora que j'ai rencontré pendant ma thèse. Eli, toi qui a guidé mes premiers pas à la paillasse, je te souhaite toute la réussite et le bonheur pour la suite.

Didier Devys, les post-docs Mattia, Elmar, Brendan, Bill, Traci, Zita, Evi, Nathalie, je vous remercie pour vos précieux conseils et votre bonne humeur.

Flavie, Claire, Mate, Laure, Adrien, Emese, Antoinette, je n'oublie pas les petits moments sympas passés ensemble : l'ambiance du labo est vraiment bien : merci !

Je tiens également à remercier les personnes qui se sont attaquées à relire et corriger ma thèse, Fabien Moritz, Irina Holfert, Martine Moritz, Laure Jobert, Mattia Frontini.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué à me remonter le moral durant cette thèse, Valérie Kedinger, Simone de Beauvoir, Fabien Moritz, Jean Hardy, les papous dans la tête, Bernadette Hardy, Pascal Drane, Louis Calaferte, Claire Leurent, Haruki Murakami, Louise Hardy, Jean Genet, Aurélie Rossin, Witold Gombrowicz, Emmanuel Compe, Pierre Bourdieu, Claire Becquart, Colin Logie.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| <u>REMERCIEMENTS</u> | 1 |
| <u>SOMMAIRE</u> | 2 |
| <u>LISTE DES FIGURES</u> | 9 |
| <u>LISTE DES ABREVIATIONS</u> | 11 |
| <u>1 - INTRODUCTION</u> | 15 |
| <u><i>1.1 - L'initiation de la transcription des gènes chez les eucaryotes supérieurs, étape très contrôlée.</i></u> | 15 |
| <u><i>1.2 - Plusieurs ARN polymérases assurent la transcription des gènes chez les eucaryotes supérieurs.</i></u> | 15 |
| <u><i>1.3 - La transcription des gènes de classe II décomposée en diverses étapes.</i></u> | 16 |
| <u><i>1.4 - Le laboratoire du Dr TORA découvre un nouveau complexe multiprotéique impliqué dans l'initiation de la transcription.</i></u> | 17 |
| <u><i>1.5 - Focalisation de la présente thèse.</i></u> | 18 |
| <u>2 - L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DES GENES DE CLASSE II CHEZ LES EUCARYOTES SUPERIEURS</u> | 20 |
| <u><i>2.1 - Les différents types de promoteurs</i></u> | 20 |
| 2.1.1 – Le promoteur minimal | 20 |
| 2.1.2 – Les éléments de régulation | 21 |
| 2.1.2.1 – Les séquences régulatrices proximales | 21 |
| 2.1.2.2 – Les séquences régulatrices distales | 22 |
| <u><i>2.2 - Modèles d'assemblage des différents facteurs dits «généraux» de la transcription</i></u> | 22 |
| 2.2.1 – L'acteur principal de la transcription, l'ARN polymérase II | 23 |
| 2.2.2 – Modèle séquentiel de l'assemblage du PIC | 24 |
| 2.2.2.1 – Reconnaissance du promoteur minimal par TFIID | 25 |
| 2.2.2.2 – Reconnaissance du complexe TFIID/promoteur par TFIIA | 26 |
| 2.2.2.3 – Reconnaissance du complexe TFIID/TFIIA/promoteur par TFIIIB | 26 |
| 2.2.2.4 – Recrutement du complexe TFIIF/ARN pol II | 26 |
| 2.2.2.5 – Liaison de TFIIIE et TFIIH au PIC alors complet | 27 |
| 2.2.3 – Modèle de l'holoenzyme | 27 |
| 2.2.4 – Intermédiaire entre les deux modèles d'assemblage du PIC | 28 |
| <u><i>2.3 - Déroulement de l'initiation de la transcription</i></u> | 28 |
| 2.3.1 – L'ouverture de l'ADN ou « bulle » de transcription et l'allongement de la bulle | 28 |
| 2.3.2 – Le relargage des facteurs d'initiation, simultanément au recrutement des facteurs d'élongation | 28 |
| <u><i>2.4 - Elongation et terminaison de la transcription</i></u> | 29 |
| 2.4.1 – Présentation de quelques facteurs qui stimulent l'élongation de la transcription par phosphorylation du CTD | 29 |
| 2.4.2 – Stabilisation de la polymérase sur l'ADN | 29 |
| 2.4.3 – Reprise de la transcription après l'arrêt de la polymérase | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.4 – Facteurs favorisant l’arrêt de la polymérase..... | 30 |
| 2.4.5 – Importance de l’environnement créé par la chromatine..... | 30 |
| 2.4.6 – Terminaison de la transcription..... | 31 |
| 3 – L’ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION : IMPORTANCE DE L’ENVIRONNEMENT CREE PAR LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE | 32 |
| <u>3.1 – Brève introduction sur les activateurs de la transcription.....</u> | 32 |
| 3.1.1 – Quelques mécanismes d’action des activateurs..... | 32 |
| 3.1.2 – Quelques exemples d’activateurs transcriptionnels | 33 |
| 3.1.3 – Les activateurs ont besoin de cofacteurs pour activer la transcription..... | 33 |
| <u>3.2 – Implication de la structure de la chromatine dans la régulation de la transcription : contexte répressif mais informatif.....</u> | 34 |
| 3.2.1 – Structure de la chromatine..... | 34 |
| 3.2.1.1 – Structure du nucléosome..... | 34 |
| 3.2.1.2 – Stabilité des nucléosomes..... | 35 |
| 3.2.1.3 – Les pseudo-nucléosomes..... | 36 |
| 3.2.1.4 – Assemblage des nucléosomes pour former une structure compacte..... | 36 |
| 3.2.2 – Notions d’euchromatine et d’hétérochromatine..... | 38 |
| 3.2.3 – La chromatine comme support de l’information épigénétique | 39 |
| 3.2.4 – Les variants d’histones | 39 |
| 3.2.5 – La structure de la chromatine dynamique | 39 |
| <u>3.3 – Les coactivateurs transcriptionnels contribuent à créer un environnement chromatinien adéquat à la transcription.....</u> | 40 |
| 3.3.1 – Brève introduction sur les cofacteurs | 40 |
| 3.3.2 – Les protéines qui remodelent la chromatine en présence d’ATP : exemple du complexe SWI/SNF..... | 43 |
| 3.3.2.1 – Introduction | 43 |
| 3.3.2.2 – Fonctions des complexes SWI/SNF..... | 43 |
| 3.3.2.3 – Mécanismes proposés pour remodeler la chromatine en présence d’ATP... .. | 43 |
| 3.3.2.4 – Action concertée des complexes remodelant la chromatine et des complexes acétylant la chromatine..... | 44 |
| <u>3.4 – Les protéines capables d’induire des modifications post-traductionnelles au niveau des histones.....</u> | 44 |
| 3.4.1 – Le code des histones et le code activateur..... | 45 |
| 3.4.1.1 – Le code des histones..... | 45 |
| 3.4.1.2 – Différentes modifications post-traductionnelles au niveau des histones | 45 |
| 3.4.1.3 – Influence des modifications les unes sur les autres..... | 46 |
| 3.4.1.4 – Le code des cofacteurs | 46 |
| 3.4.1.5 – Plateforme formée par différentes modifications post-traductionnelles au niveau des histones..... | 46 |
| 3.4.2 – Les protéines douées d’activité HAT (Histone Acétyl Transférase)..... | 46 |
| 3.4.2.1 – Différents mécanismes tentent d’expliquer l’implication de protéines douées d’activité HAT dans l’activation de la transcription | 47 |
| 3.4.2.2 – La superfamille GNATs (Gcn5-related acetyltransferases)..... | 49 |
| 3.4.2.2.1 – Structure de la superfamille GNAT | 49 |
| 3.4.2.2.2 – GCN5 /PCAF | 49 |
| 3.4.2.2.2.1 – yGcn5 | 49 |
| 3.4.2.2.2.2 – GCN5 et PCAF..... | 50 |

| | |
|--|----|
| 3.4.2.2.2.1 - Fonctions communes à GCN5 et PCAF | 51 |
| 3.4.2.2.2.2 - Fonctions spécifiques à PCAF | 51 |
| 3.4.2.3 – p300/CBP | 52 |
| 3.4.2.3.1 – p300 et le contrôle du cycle cellulaire | 52 |
| 3.4.2.3.2 – p300 et l’apoptose | 52 |
| 3.4.2.3.3 – p300, un coactivateur transcriptionnel | 52 |
| 3.4.2.3.4 – Mécanismes proposés pour expliquer l’implication de p300 dans l’activation de la transcription | 54 |
| 3.4.2.3.4.1 – p300 comme pont moléculaire | 55 |
| 3.4.2.3.4.2 – p300, base pour l’assemblage de complexes multiprotéiques | 56 |
| 3.4.2.3.4.3 – p300 régule la transcription grâce à son activité d’acétylation des histones | 56 |
| 3.4.2.3.4.4 – L’acétylation de certains facteurs de transcription par p300 | 56 |
| 3.4.2.3.5 – p300 comme intégrateur de signaux cellulaires | 57 |
| 3.4.2.4 – La famille MYST | 57 |
| 3.4.2.4.1 – Les HAT TIP60 et Esa1 | 58 |
| 3.4.2.4.1.1 – TIP60 impliquée dans l’activation de la transcription par p53 | 58 |
| 3.4.2.4.1.2 – TIP60, coactivateur de la transcription | 59 |
| 3.4.2.4.1.3 – TIP60 et la réparation des cassures d’ADN | 60 |
| 3.4.2.4.1.4 – Brève conclusion sur les protéines TIP60 | 60 |
| 3.4.2.4.2 – L’HAT MOF, membre de la famille MYST | 60 |
| 3.4.2.4.3 – Les protéines Sas2 et Sas3, membres de la famille MYST | 61 |
| 3.4.2.5 – Les protéines de la famille MYST, brève conclusion | 61 |
| 3.4.2.6 – Equilibre entre les activités HAT et HDAC | 61 |
| 3.4.3 – Autres modifications covalentes au niveau de l’extrémité N-terminale des histones | 62 |
| 3.4.3.1 – Phosphorylation des histones et activation de la transcription | 62 |
| 3.4.3.2 – Méthylation des histones | 62 |
| 3.4.3.2.1 – Méthylation des histones et activation de la transcription | 62 |
| 3.4.3.2.2 – Méthylation des histones et inhibition de la transcription | 63 |
| 3.4.3.3 – Ubiquitination des histones et activation de la transcription | 63 |
| 3.4.4 – Conséquences des modifications post-traductionnelles de l’extrémité N-terminale des histones | 65 |
| 3.4.4.1 – Reconnaissance des modifications post-traductionnelles sur l’extrémité N-terminale des histones | 65 |
| 3.4.4.2 – Les modifications post-traductionnelles marquent différentes régions de la chromatine | 66 |
| 4 - LES PROTEINES CAPABLES D’ACETYLER LES HISTONES SONT RETROUVEES AU SEIN DE COMPLEXES MULTIPROTEIQUES | 68 |
| 4.1 - Association des protéines en complexes | 68 |
| 4.2 - Les complexes NuA4 et TIP60 | 70 |
| 4.2.1 – Etudes fonctionnelles du complexe TIP60 | 70 |
| 4.2.1.1 – Le complexe TIP60 et l’activation de la transcription | 70 |
| 4.2.1.2 – Le complexe TIP60 et la réparation des cassures double-brin de l’ADN | 71 |
| 4.2.2 – Etudes fonctionnelles du complexe NuA4 | 71 |
| 4.2.2.1 – NuA4 et l’activation de la transcription | 72 |
| 4.2.2.2 – NuA4 et la réparation des dommages à l’ADN | 72 |
| 4.2.3 – Complexes NuA4 et TIP60 impliqués dans la transcription et la réparation des cassures d’ADN | 73 |

| | |
|--|------------|
| <u>4.3 – Le complexe Médiateur</u> | 73 |
| 4.3.1 – Structure des complexes de type Médiateur..... | 74 |
| 4.3.2 – Implication du complexe Médiateur dans l’activation de la transcription par GAL4-VP16..... | 75 |
| 4.3.3 – Liaison des complexes Médiateur avec l’ARN polymérase II..... | 76 |
| 4.3.4 – Le complexe Médiateur et le complexe TFIID : Redondance ou synergie ?..... | 77 |
| <u>4.4 – Le complexe hTFIID</u> | 77 |
| 4.4.1 – TBP/TFIID..... | 77 |
| 4.4.1.1 – Structure et liaison à l’ADN..... | 77 |
| 4.4.1.2 – Fonctions de TBP..... | 79 |
| 4.4.2 – Les Tafs..... | 80 |
| 4.4.2.1 – Structure en pseudonucléosomes..... | 80 |
| 4.4.2.2 – Implication des TAFs dans la transcription..... | 81 |
| 4.4.2.2.1 – Les TAFs, médiateurs de l’activation de la transcription..... | 81 |
| 4.4.2.2.2 – Mécanismes d’action proposés pour expliquer le rôle des TAFs dans l’activation de la transcription..... | 81 |
| 4.4.2.2.3 – Modifications de la structure de la chromatine par les TAFs..... | 83 |
| 4.4.3 – Variabilité du complexe TFIID..... | 84 |
| 4.4.4 – Les TAFs sans TBP..... | 86 |
| <u>4.5 – Les complexes SAGA, TFTC/STAGA /PCAF</u> | 86 |
| 4.5.1 – Le complexe de levure SAGA..... | 86 |
| 4.5.1.1 – Composition et études structurales du complexe SAGA..... | 86 |
| 4.5.1.2 – SAGA, coactivateur transcriptionnel..... | 87 |
| 4.5.1.3 – Le complexe SAGA, doué d’activité HAT..... | 89 |
| 4.5.1.4 – Présentation de quelques sous-unités du complexe SAGA..... | 90 |
| 4.5.1.5 – Modularité des complexes SAGA..... | 90 |
| 4.5.1.6 – Action concertée des complexes SAGA/ complexe Mediateur et SAGA/Swi/Snf..... | 91 |
| 4.5.2 – Le complexe PCAF..... | 92 |
| 4.5.3 – Le complexe STAGA (SPT3-TAF(II)31-GCN5L acetylase)..... | 92 |
| 4.5.3.1 – Composition du complexe STAGA..... | 92 |
| 4.5.3.2 – Fonctions du complexe STAGA..... | 93 |
| 4.5.4 – Le complexe TFTC..... | 93 |
| 4.5.4.1 – Caractérisation biochimique et structurale..... | 93 |
| 4.5.4.1.1 – La composition en protéines..... | 94 |
| 4.5.4.1.2 – La structure du complexe TFTC..... | 94 |
| 4.5.4.2 – Etudes fonctionnelles..... | 95 |
| 4.5.4.2.1 – Test de transcription in vitro..... | 95 |
| 4.5.4.2.2 – Test HAT..... | 96 |
| 4.5.4.2.3 – TFTC, coactivateur de la transcription..... | 96 |
| 4.5.4.2.4 – TFTC impliqué dans la réparation par excision de nucléotides..... | 96 |
| <u>4.6 – Assemblage des protéines en complexes : brève discussion</u> | 97 |
| 5 – FOCALISATION DU TRAVAIL DE THESE SUR L’ETUDE DE LA PROTEINE hTRRAP (TRansformation/tRanscription-domain-Associated Protein) | 99 |
| <u>5.1 – Quelques informations sur la protéine hTRRAP</u> | 99 |
| <u>5.2 – hTRRAP au sein de divers complexes multiprotéiques</u> | 100 |
| 5.2.1 – hTRRAP dans les complexes TFTC, PCAF, STAGA..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.2 – hTRRAP dans le complexe TIP60 | 102 |
| 5.2.3 – hTRRAP dans les complexes liés à c-myc ou à E1A | 102 |
| 5.2.3.1 – c-myc, brève introduction | 102 |
| 5.2.3.2 – hTRRAP et les complexes liés à c-myc | 102 |
| 5.2.3.3 – L'oncoprotéine E1A, brève introduction | 103 |
| 5.2.3.4 – hTRRAP et les complexes liés à E1A | 103 |
| 5.2.4 – hTRRAP au sein de complexes doués ou dénués d'activités HATs | 103 |
| 5.3 – Fonctions associées à hTRRAP | 104 |
| 5.3.1 – Coactivateur transcriptionnel | 104 |
| 5.3.1.1 – Tra1 se lie directement à des activateurs transcriptionnels | 104 |
| 5.3.1.2 – La liaison de TRRAP à c-myc, E2F, p53 et aux récepteurs nucléaires | 104 |
| 5.3.1.3 – TRRAP : un tremplin pour le recrutement des enzymes doués d'activité HAT | 104 |
| 5.3.2 – Régulation du cycle cellulaire | 105 |
| 5.3.3 – hTRRAP et la réparation de l'ADN | 105 |
| 6 – COUPLAGE TRANSCRIPTION/REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN | 107 |
| 6.1 – hTRRAP à l'interface de la transcription et de la réparation | 107 |
| 6.2 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN dans le contexte de la chromatine | 107 |
| 6.2.1 – Implication des modifications post-traductionnelles dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN | 107 |
| 6.2.1.1 – La phosphorylation des histones est un marqueur de la réparation des cassures double-brin de l'ADN | 108 |
| 6.2.1.2 – Acétylation des histones et réparation des cassures double-brin de l'ADN | 109 |
| 6.2.1.3 – Combinaison de différentes modifications post-traductionnelles | 110 |
| 6.2.1.4 – Autres modifications de la structure de la chromatine impliquées dans la réparation des cassures d'ADN | 111 |
| 6.2.2 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (HR pour Homologous recombination) | 113 |
| 6.2.3 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN par « NHEJ » | 114 |
| 6.2.4 – Les protéines impliquées dans la réparation des DSBs par NHEJ | 114 |
| 6.2.4.1 – Les protéines kinases au centre de la réparation des cassures double-brin de l'ADN | 114 |
| 6.2.4.1.1 – Implication des DNA-PK dans la réparation par NHEJ | 115 |
| 6.2.4.1.2 – Implication d'ATM et ATR dans la réparation des cassures doubles-brins de l'ADN | 115 |
| 6.2.4.1.3 – ATM et hTRRAP | 117 |
| 6.2.4.2 – Le complexe Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) | 117 |
| 6.2.4.2.1 – La protéine Mre11 | 119 |
| 6.2.4.2.2 – La protéine RAD50 | 120 |
| 6.2.4.2.3 – La protéine NBS1 | 120 |
| 6.2.4.2.4 – Implication du complexe MRN dans le processus de NHEJ, discussion | 121 |
| 6.2.4.2.5 – MRN et le contrôle du cycle cellulaire | 122 |
| 6.2.4.2.6 – Le complexe MRN, conclusion | 122 |
| 6.2.5 – La réparation des cassures double-brin, brève conclusion | 122 |

| | |
|--|-----|
| <u>1 – Etudes fonctionnelles du complexe multiprotéique TFTC : TFTC et p300 coopèrent pour activer la transcription</u> | 124 |
| <u>1.1 – Introduction</u> | 124 |
| <u>1.2 – La publication</u> | 124 |
| <u>1.3 – Brève conclusion</u> | 125 |
| <u>1.3.1 – p300 et GCN5 n’ont pas le même profil d’acétylation des histones</u> | 125 |
| <u>1.3.2 – p300 recrute TFTC</u> | 125 |
| <u>1.3.3 – p300 crée un contexte structural adéquat à l’action du complexe TFTC</u> | 126 |
| <u>1.3.4 – p300 acétyle des facteurs de transcription</u> | 126 |
| <u>1.3.5 – p300 et GCN5 interagissent avec des formes différentes de l’ARN polymérase II</u> | 126 |
| <u>2 – Dynamique d’assemblage des cofacteurs au niveau de promoteurs endogènes</u> | 127 |
| <u>2.1 – Introduction</u> | 127 |
| <u>2.1.1 – Brève introduction sur les récepteurs aux œstrogènes</u> | 127 |
| <u>2.1.2 – Quelques coactivateurs du récepteur aux œstrogènes α</u> | 128 |
| <u>2.1.3 – TFTC : impliqué dans l’activation de la transcription par les œstrogènes ?</u> | 128 |
| <u>2.2 – Matériels et méthodes</u> | 129 |
| <u>2.3 – Résultats</u> | 131 |
| <u>2.3.1 – hTRRAP et p300 coopèrent pour activer la transcription par ER en présence d’œstrogène</u> | 131 |
| <u>2.3.2 – Quantification de l’expression du gène pS2 dans les cellules MCF7 après induction par E2</u> | 132 |
| <u>2.3.3 – Dynamique d’assemblage des cofacteurs au niveau des promoteurs endogènes de pS2 et de la cathepsine D</u> | 133 |
| <u>2.4 – Discussion</u> | 134 |
| <u>3 – Isolement des complexes contenant la protéine hTRRAP : mise en évidence de l’interaction entre hTRRAP et les complexes Mre11/NBS1/RAD50</u> | 137 |
| <u>3.1 – Introduction</u> | 137 |
| <u>3.2 – La publication soumise à MCB</u> | 138 |
| <u>3.3 – Conclusion</u> | 139 |
| <u>4 – Mise en évidence d’une nouvelle sous-unité du complexe TFTC : Ataxin 7</u> | 140 |
| <u>4.1 – Introduction</u> | 140 |
| <u>4.1.1 – Publication 1 : ataxine 7 au sein du complexe TFTC</u> | 140 |
| <u>4.1.2 – Publication 2 (en cours de préparation) : l’expansion polyglutamine provoque une désorganisation complète de la chromatine</u> | 140 |
| <u>4.2 – Publication 1</u> | 141 |
| <u>4.3 – Publication 2</u> | 141 |
| <u>4.4 – Discussion</u> | 142 |
| <u>4.4.1 – ATX7, sous-unité du complexe TFTC</u> | 142 |
| <u>4.4.2 – Ataxie spinocerebelleuse de type 7 et désorganisation de la structure de la chromatine</u> | 143 |
| <u>1 – TRRAP, coactivateur transcriptionnel</u> | 146 |
| <u>1.1 – TRRAP et la transcription activée par VPI6 et par les œstrogènes : notre étude</u> | 146 |
| <u>1.2 – TRRAP se lie à différents activateurs</u> | 146 |
| <u>1.3 – Quels gènes cibles pour la protéine TRRAP ?</u> | 148 |

| | |
|---|------------|
| <u>1.4 – TRRAP, plateforme pour recruter des activités HATs</u> | 149 |
| 1.4.1 – TRRAP, le tremplin pour recruter des activités HATs..... | 149 |
| 1.4.1.1 – Les activités HATs liées à TRRAP sont modulables..... | 149 |
| 1.4.1.2 – Les deux HATs GCN5 et TIP60 requises pour activer la transcription de certains gènes | 150 |
| 1.4.1.3 – Modèle de recrutement des HATs GCN5 et TIP60 sur différents promoteurs | 151 |
| 1.4.2 – Activités HATs liées à TRRAP et p300..... | 154 |
| <u>1.5 – TRRAP et la transcription, brève conclusion</u> | 155 |
| 2 – TRRAP, implication dans la réparation des cassures d’ADN | 156 |
| <u>2.1 – Intervention de la protéine TRRAP dans la réparation par NHEJ</u> | 156 |
| <u>2.2 – Intervention indirecte de la protéine TRRAP dans la réparation des cassures double-brin de l’ADN</u> | 158 |
| 2.2.1 – TRRAP recrute les activités HATs au niveau des sites de cassures | 158 |
| 2.2.1.1 – TRRAP/MRN dépourvu d’activité HAT | 158 |
| 2.2.1.2 – TRRAP au sein de complexes HATs impliqués dans la réparation de l’ADN | 158 |
| 2.2.1.3 – Modèle d’intervention de TRRAP dans la réparation des DSBs | 159 |
| 2.2.2 – TRRAP dans les cascades de signalisation suite à l’induction de cassures | 160 |
| 2.2.2.1 – TRRAP impliquée dans les mêmes voies de signalisation que MRN ? | 160 |
| 2.2.2.2 – TRRAP impliqué dans les mêmes voies de signalisation que les ATM ? | 160 |
| 2.2.2.2.1 – TRRAP et ATM partagent des interactants..... | 160 |
| 2.2.2.2.2 – TRRAP et ATM : interactants communs, mais fonctions différentes ? | 161 |
| 2.2.2.2.3 – Interdépendance ATM/TRRAP..... | 161 |
| 2.2.2.2.4 – TRRAP et la régulation du point de contrôle mitotique et G2/M | 162 |
| 2.2.3 – TRRAP impliquée dans les mêmes voies de signalisation que p53 ? | 164 |
| 2.2.4 – L’intervention de TRRAP dans la réparation n’exclut pas une implication de TRRAP dans la régulation transcriptionnelle suite à l’induction de DSBs..... | 164 |
| 3 – Bilan, TRRAP au sein de multiples complexes | 165 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : L'expression génique, représentation schématique | 17 |
| Figure 2 : Résumé des études présentées dans cette thèse | 19 |
| Figure 3 : Représentation schématique des différentes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de la transcription | 21 |
| Figure 4 : Structure de l'ARN polymérase II | 23 |
| Figure 5 : Modèle séquentiel d'assemblage du PIC in vitro, sur un promoteur contenant une boîte TATA | 25 |
| Figure 6 : Les activateurs transcriptionnels se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques et recrutent de nombreux cofacteurs protéiques | 32 |
| Figure 7 : Représentation schématique d'un activateur proximal | 33 |
| Figure 8 : Structure atomique d'un nucléosome résolue par cristallographie aux rayons X ... 35 | 35 |
| Figure 9 : Images en microscopie électronique de différents agencements ADN-nucléosomes | 36 |
| Figure 10 : Modèles d'organisation de la fibre de chromatine | 37 |
| Figure 11 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN | 38 |
| Figure 12 : La chromatine est une structure dynamique | 40 |
| Figure 13 : les complexes HAT et SWI/SNF contribuent à déstabiliser les interactions ADN/nucléosomes. Modèle de la mobilité des nucléosomes | 42 |
| Figure 14 : Alignement des protéines de la superfamille GNAT, le sous-groupe Gcn5 | 49 |
| Figure 15 : Organisation des protéines CBP/p300 | 54 |
| Figure 16 : Modèles d'action de p300 dans l'activation de la transcription | 55 |
| Figure 17 : Alignement des protéines de la famille MYST | 57 |
| Figure 18 : Représentation schématique de différentes modifications post-traductionnelles au niveau de l'extrémité N-terminale des histones | 64 |
| Figure 19 : Structure tridimensionnelle du complexe Médiateur résolue par microscopie électronique | 75 |
| Figure 20 : Le complexe Médiateur : modèle d'activation de la transcription par les activateurs VP16, GCN4 et GAL4 | 76 |
| Figure 21 : Structure de TBP lié à l'ADN | 78 |
| Figure 22 : Immunolocalisation des TAFs dans γTFIID par microscopie électronique | 78 |
| Figure 23 : Différents stades de l'expression des gènes | 83 |
| Figure 24 : Représentation schématique de divers complexes TFIID | 85 |
| Figure 25 : Structure du complexe SAGA résolue par microscopie électronique | 87 |
| Figure 26 : SAGA, coactivateur transcriptionnel. Résumé de l'assemblage des complexes multiprotéiques au niveau du promoteur <i>GALI</i> | 88 |
| Figure 27 : représentation schématique des complexes TFIID et TFIC | 94 |
| Figure 28 : TFIC et TFIID, structures tridimensionnelles des complexes TFIID en haut (A) et TFIC en bas (B), résolue par microscopie électronique | 95 |
| Figure 29 : TFIC, doué d'activité HAT, est impliqué dans l'activation de la transcription ou dans la réparation par excision de nucléotides | 97 |
| Figure 30 : Famille PI3KK : taille et motifs en commun | 99 |
| Figure 31 : mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN dans le contexte chromatinien | 112 |

| | |
|--|-----|
| <u>Figure 32 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin d'ADN par recombinaison homologue ou par NHEJ</u> | 113 |
| <u>Figure 33 : L'induction de DSBs provoque la phosphorylation de H2AX : amplification du signal</u> | 117 |
| <u>Figure 34 : Domaines fonctionnels et architecture des protéines du complexe MRN</u> | 119 |
| <u>Figure 35 : TRRAP et p300 sont conjointement requis pour activer la transcription par les œstrogènes</u> | 132 |
| <u>Figure 36 : La transcription du gène pS2 est activée par les œstrogènes dans les cellules MCF7</u> | 133 |
| <u>Figure 37 : Dynamique d'assemblage des facteurs ER, TBP, TAF10 et TRRAP au niveau des promoteurs endogènes de pS2 et de la cathepsine D</u> | 134 |
| <u>Figure 38 : Différents domaines de TRRAP interagissent avec diverse protéines</u> | 148 |
| <u>Figure 39 : Modèle de recrutement de TRRAP et des HATs lors de l'activation de la transcription par VP16 et par les œstrogènes</u> | 152 |
| <u>Figure 40 : Modèle de recrutement de TRRAP et des HATs au niveau du promoteur pS2</u> .. | 153 |
| <u>Figure 41 : Les ATMs activent les points de contrôle du cycle cellulaire après induction de DSBs</u> | 163 |

LISTE DES ABREVIATIONS

Acétyl-CoA : Acétyl coenzyme A
ACTR : *Activin type receptor*
ADA : *ADaptator*
AdMLP : promoteur tardif de l'adénovirus
ADN : acide désoxyribonucléique
APP : *Amyloid Protein Precursor*
AR : *Androgen Receptor*
ARC : *Activator-Recruited Cofactor*
ARN pol II : l'ARN polymérase II
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ARC : *SREBP-interacting complex*
Arp : *Actin related protein*
ARR : *Access Repair Restaura*
ATM : *Ataxia-Telangiectasia Mutated*
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATR : *ATM-Rad3-Related*

BAF 53 : *BRG1/brm-Associated factor 53*
BRCT : *BRAC1 C-Terminal Domain*
BRE : *TFIIB Responsive Element*
BRG : *Brm-Related Gene 1*
BRM : Brahma

CAF-1 : *Chromatin Assembly Factor-1*
CARM1 : *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*
CATD : Cathepsine D
CBP : *CREB Binding Protein*
Cdks : cycline dépendantes des kinases
ChIP : *Chromatin Immunoprecipitation*
CPT : camptothécine
CPSF : *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*
CREB : *cAMP Responsive Element*
CRSP : *Cofactor Required for Sp1*
CTD : *Carboxy Terminal Domain*
CTF : *CAAT box Transcription Factor*
CTDK-1 : *Carboxy Terminal Domain Kinase 1*

DNA-PKcs : *DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*
DPE : *Downstream Promoter Element*
DRIP : *vitamin D Receptor (VDR) Interacting Complex*
DSB : *Double Strand Break*
DSIF : *DRB Sensitivity Inducing Factor*
E2 : 17 β -oestadiol
EKLF : *erythroid krüppel-like factor*

Esa1 : *Essential SAS2-related Acetyltransferase*
E-R : Esa1-Rpd3
ER : *Estrogen Receptor*
ERE : *Estrogen Response Element*

FACS : *Fluorescence-Activated Cell Sorter*
FAT : FRAP, ATM, TRRAP
FATC : *FAT C-terminal domain*
FATC : *Facilitates Chromatin Transcription*
FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfert*

Gcn5 : *General Control Nonderepressible-5*
GNAT : *Gcn5-Related N-Acetyltransferase*
GST : *Gluthation-S-Transferase*
GTFs : *General Transcription Factors*

HAT : *Histone Acétyl Transférase*
HDAC : *Histone Desacétylase*
HMG : *Hight Mobility Group*
HMT : *Histone Méthyl-Transférase*
HNF-4 : *Hepatocyte Nuclear Factor 4*
HR : *Homologous Recombination*

IFN : *Interferon*
Inr : *élément Initiateur*
IP : *Immonoprécipitation*
ISWI : *Imitation SWItch*

kb : *kilobases*
kDa : *kiloDalton*
KO : *Knock-Out*

LCR : *Locus Control Region*

MAPK : *Mitogen Activating Protein Kinase*
Mdm2 : *murin double minute 2*
MMS : *Méthyl-Methane-Sulfonate*
MRN : *complexe MRE11/RAD50/NBS1*
MYST : *MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 Tip60*

NAT : *negative regulator of activated transcription*
NC : *Cofacteurs négatifs*
NELF : *Negativ Elongation Factor*
NER : *Nucleotide Excision Repair*
NF1 : *Nuclear Factor 1*
NFκB : *nuclear factor kappa-B*
NHEJ : *Non Homologous End Joining*
nm : *nanomètre*
NR : *Nuclear Receptor*
NURF : *Nucleosome Remodelling Factor*

ORF : *Open Reading Frame*

PCAF : *p300/CBP Associated Factor*

pb : *paires de bases*

PIC : *Preinitiation Complex*

PI3K : *Phosphatidyl Inositol-3 related Kinase*

PPAR : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

PP2A : *Protein Phosphatase 2A*

PRMT : *Protein Arginine Methyltransferase 1*

p-TEFb : *positiv Transcription Elongation Factor b*

RBP : *RNA polymerase B*

RNAi : *RNA interfering*

RSC : *Remodeling and Spacing Complex*

RSF : *Remodeling and Spacing Factor*

RXR : *Récepteur aux rétinoïdes*

SAGA : *Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase*

SALSA : *SAGA altered, Spt8 absent*

SLIK : *SAGA-like*

SMCC : *SRB/MED containing Cofactor Complexes*

SPT : *Supressor of Ty*

SREBP : *Sterol-Responsive Enhancer Binding Protéine*

SRC-1 : *Steroid Receptor Coactivator protein 1*

STAGA : *SPT3-TAF9-GCN5L Acetylase*

SWI/SNF : *faulty mating-type switching/sucrose non fermenting*

TAF : *TBP Associated Factor*

TERT : *Telomerase Reverse Transcriptase*

TBP : *TATA Binding Protein*

TFTC : *TBP-Free TAF containing Complex*

TFIIA : *Transcription Factor IIA*

TFIIB : *Transcription Factor IIB*

TFIID : *Transcription Factor IID*

TFIIE : *Transcription Factor IIE*

TFIIF : *Transcription Factor IIF*

TFIIH : *Transcription Factor IIF*

TIP60 : *HIV-1-Tat-Interactive Protein*

TIP49 : *49 kDa TBP-Interacting protein*

TLF : *TBP-Like Factor*

TR : *Thyroid hormone Receptor*

TRAP : *Thyroid hormone Receptor (TR)-Associated Protein*

TRF1 : *TBP Related Factor 1*

TRRAP : *Transformation/tRanscription-domain-Associated-Protein*

UAS : *Upstream Activating Sequence*

Ubp8 : *H2B Ubiquitin Protease*

URS : *Upstream Repressing Sequence*

UV : *Ultra-Violet*

VDR : *Vitamin D Receptor*

VP16 : *herpes simplex virus protein 16*

INTRODUCTION

1 – INTRODUCTION

1.1 – L’initiation de la transcription des gènes chez les eucaryotes supérieurs, étape très contrôlée

Les cellules d’un même organisme sont dotées d’un patrimoine génétique identique, cependant l’expression de ces gènes diffère en fonction du type, de la différenciation, du développement de ces cellules, ce qui permet d’assurer des fonctions cellulaires très diverses.

L’acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l’information génétique. Il contient des séquences codantes (ou gènes) qui sont transcrites en acide ribonucléique (ARN) par des ARN polymérase ADN dépendantes, avant d’être traduites en protéines. Cette étape intermédiaire entre le gène et la protéine constitue une opportunité de choix entre différents gènes à transcrire.

La transcription est divisée en trois grandes étapes : l’initiation (synthèse des premiers nucléotides), l’élongation (allongement de la chaîne d’ARN) et la terminaison (libération du pré-ARN messenger, et départ de la machinerie de transcription de l’ADN).

L’étape d’initiation de la transcription des gènes s’avère primordiale pour le choix des gènes à transcrire au cours des différents processus cellulaires. Divers facteurs protéiques impliqués dans la reconnaissance des gènes à transcrire, permettent de réguler finement l’expression de ceux-ci. Certains de ces facteurs s’agencent en complexes multiprotéiques et font l’objet de cette thèse.

1.2 – Plusieurs ARN polymérase assurent la transcription des gènes chez les eucaryotes supérieurs

Chez les organismes procaryotes, une seule ARN polymérase est responsable de la transcription de l’ensemble des gènes. Ce n’est pas le cas pour les eucaryotes, chez lesquels trois classes de gènes sont transcrites par des enzymes distinctes.

En bref, les gènes de classe I sont transcrits par l’ARN polymérase I et codent pour les ARN ribosomiques de grande taille (ARNr) qui jouent un rôle direct dans la synthèse des protéines (traduction).

Les gènes de classe III codent pour l’ARNr 5S et les ARN de transfert (ARNt) impliqués dans le transport des acides aminés lors de la synthèse des protéines. La polymérase III permet également la transcription du gène codant pour le petit ARN nucléaire U6 (ARNsnU6).

Enfin, les gènes qui codent pour des ARN messagers (ARNm) qui sont finalement traduits en protéines, et les gènes qui codent pour les autres petits ARN nucléaires (ARNsn), sont transcrits par l’ARN polymérase II associée à des facteurs de transcription, dits de classe II. Seule la transcription des gènes de classe II est étudiée dans cette thèse.

1.3 – La transcription des gènes de classe II décomposée en diverses étapes

Le mécanisme de transcription peut être divisé en une succession d'étapes : **initiation** de la synthèse d'ARN (mise en place de la machinerie moléculaire et synthèse des premiers nucléotides), **élongation** du transcrit (allongement de la chaîne d'ARN) et correction des erreurs éventuelles, **terminaison** de la synthèse (libération de l'ARN pré-messager et départ de l'ARN polymérase II). Simultanément à leur transcription, les ARN messagers subissent de nombreuses transformations avant d'être exportés vers le noyau : c'est la **maturation** du pré-ARNm en ARNm fonctionnel. Il est très important de souligner que l'ensemble des réactions de transcription et de maturation de l'ARN messenger sont couplées.

En bref, la maturation des ARN comprend **l'addition d'une coiffe en 5'** (résidu 7 méthyl guanosine) connue pour protéger le transcrit d'une dégradation par les nucléases cellulaires, **l'épissage**, qui permet d'éliminer les régions non codantes du transcrit, ainsi que la **polyadénylation** du transcrit à l'extrémité 3'. L'étape d'épissage alternatif peut aboutir, pour certains ARN prémessagers, à la production de protéines différentes à partir du même ARN prémessager, et constitue donc une étape supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes.

Figure 1 : L'expression génique, représentation schématique, d'après (Orphanides and Reinberg, 2002).

Lors de l'expression d'un gène, chaque étape est physiquement et fonctionnellement connectée à la suivante : alors que l'ARNm est synthétisé, il est mûri (ajout d'une coiffe en 5' et épissage). La terminaison de la transcription est marquée par le clivage de l'ARNm, puis sa polyadénylation en 3', suivie de son exportation dans le cytoplasme.

1.4 - Le laboratoire du Dr TORA découvre un nouveau complexe multiprotéique impliqué dans l'initiation de la transcription

Le laboratoire au sein duquel j'ai travaillé pendant ma thèse s'intéresse à la transcription des gènes de classe II et plus particulièrement à l'étape d'initiation, dans la mesure où cette étape joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. L'initiation de la transcription débute par l'assemblage de complexes multiprotéiques sur le promoteur.

Le complexe **TFIID** semble reconnaître précocement le promoteur. Il est constitué de la protéine TBP (« *TATA-Binding Protein* ») capable de reconnaître une séquence d'ADN appelée « boîte TATA » d'une part, et d'un assemblage de protéines TAFs (« *class II TBP-*

Associated Factors ») d'autre part. Lors d'une purification du complexe TFIID dans notre laboratoire, une fraction sans protéine TBP a été identifiée. Elle contenait toujours des TAFs associés à d'autres facteurs. Après diverses caractérisations, biochimiques et structurales, il s'est avéré que cette fraction contenait un nouveau complexe multiprotéique stable appelé **TFTC**, autrement dit : « *TBP Free TAF Containing Complex* ».

Au laboratoire, des études fonctionnelles sur TFTC ont alors été menées.

In vitro, Wieczorek et al. ont pu démontrer que TFTC, tout comme TFIID, est capable **d'initier la transcription** sur un promoteur minimal dans le cadre d'un ADN nu (Wieczorek et al., 1998). De plus, TFTC, qui contient l'Histone Acétyl Transférase (HAT) hGCN5, est capable d'acétyler les histones dans un contexte nucléosomal, ce qui lui confère un rôle de **coactivateur** de la transcription sur une matrice de chromatine (Brand et al., 1999b).

1.5 – Focalisation de la présente thèse

Les études fonctionnelles du complexe TFTC ont été poursuivies. *In vitro*, dans un contexte chromatinien, TFTC perd sa capacité à initier la transcription, et nécessite la présence du cofacteur p300 pour activer la transcription par GAL4-VP16. Des expériences de transfection ont permis de montrer que certaines sous-unités de TFTC, telles que **hGCN5 ou hTRRAP, coopèrent avec p300 pour activer la transcription par GAL4-VP16 dans des cellules**.

Ensuite, des cotransfections ont été réalisées dans un système d'activation de la transfection par les œstrogènes. Grâce à ce système, nous avons également mis en évidence une coopération entre des sous-unités de TFTC (GCN5 et hTRRAP) et la protéine p300 pour activer la transcription. Nous avons alors envisagé d'étudier la **dynamique d'assemblage de ces facteurs** sur des promoteurs endogènes grâce à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Les résultats indiquent que certaines protéines d'un même complexe multiprotéique pourraient se fixer à différents moments au niveau du promoteur.

J'ai alors opté pour une focalisation de ma thèse sur l'étude de complexes multiprotéiques contenant la protéine hTRRAP. Cette protéine se retrouve au sein de plusieurs complexes multiprotéiques doués d'activité d'acétylation de l'extrémité N-terminale des histones, tels que les complexes TFTC ou TIP60. Lors de cette thèse, nous avons isolé de nouveaux interactants de la protéine hTRRAP, et notamment un complexe impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN : le **complexe MRN** (MRE11/RAD50/NBS1). Lors d'un test réalisé avec des histones libres *in vitro*, aucune activité d'acétylation des complexes hTRRAP/MRN n'a pu être détectée.

L'implication de la protéine hTRRAP dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN sera discutée dans un deuxième temps.

Un troisième volet de la thèse concerne **la mise en évidence d'une nouvelle sous-unité du complexe TFTC, la protéine ataxin 7 (ATXN7)**. Les sous-unités de TFTC et ATXN7 co-immunoprécipitent dans des extraits de cellules HeLa ou de rétines de souris. De plus, les co-immunoprécipitants de ATXN7 possèdent le même profil d'activité HAT

(Histone Acétyl Transferase) que les complexes du type TFIC, preuve supplémentaire de la présence d'ATXN7 dans TFIC.

Une anomalie génétique conduit à une protéine ATXN7 pourvue d'une expansion de polyglutamine, responsable du développement d'une maladie neurodégénérative : l'ataxie spino-cérébelleuse de type 7. Nous avons montré que l'expansion de polyglutamine provoque une désorganisation de la chromatine dans les cellules de rétine de souris et testé l'activité HAT globale de rétine de souris normales ou mutées pour ATXN7.

TRRAP, coactivateur transcriptionnel

1 – TRRAP et p300 coopèrent pour activer la transcription par VP16

2 – Dynamique d'assemblage de cofacteurs au niveau de promoteurs endogènes

TRRAP, acteur de la réparation des cassures double brin de l'ADN

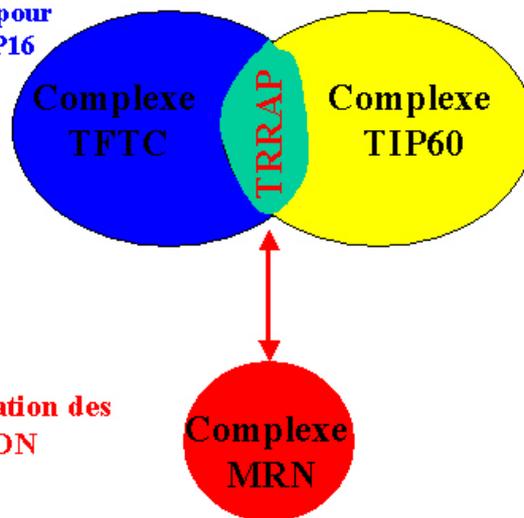


Figure 2 : Résumé des études présentées dans cette thèse

TRRAP est à la fois coactivateur de la transcription et acteur de la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

2 – L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DES GENES DE CLASSE II CHEZ LES EUCARYOTES SUPERIEURS

L'initiation de la transcription des gènes de classe II chez les eucaryotes supérieurs est actuellement un vaste champ d'investigation. Cette étape de la transcription est en effet très contrôlée et occupe une position déterminante dans le choix des gènes à transcrire.

2.1 – Les différents types de promoteurs

2.1.1 – Le promoteur minimal

Le promoteur minimal est défini comme la plus petite sous-unité nécessaire et suffisante à l'initiation *in vitro* par l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de la transcription.

L'élément principal du promoteur est la **boîte TATA** (Gannon et al., 1979) et/ou un **élément initiateur** (*Inr*). La boîte TATA, dont la séquence consensus est TATA(A/T)A(A/T), est localisée à une trentaine de bases environ en amont du site d'initiation. Cette séquence est reconnue par la machinerie de base de la transcription, *via* la protéine TBP (pour «*TATA Binding Protein*») du facteur de transcription TFIID, et elle pourrait également jouer un rôle dans la détermination du sens de la transcription. L'**élément Inr** est situé autour du site d'initiation et il est constitué d'une séquence riche en pyrimidines moins conservées que la boîte TATA. Il permet la transcription des gènes qui ne contiennent pas de boîte TATA, bien qu'on puisse le retrouver en conjonction avec celle-ci.

In vivo, le promoteur minimal semble plus complexe qu'il n'y paraît, car d'autres éléments peuvent lui être nécessaires. D'autres séquences spécifiques ont ainsi pu être caractérisées. La **séquence BRE** (*TFIIB Responsive Element*) riche en guanine et située en amont de la boîte TATA, est reconnue spécifiquement par le facteur général de transcription TFIIB et elle est présente dans environ 12% des promoteurs (Lagrange et al., 1998). La **séquence DPE** (*Downstream Promoter Element*), faiblement conservée, et située à environ trente paires de bases du promoteur dans les gènes dépourvus de boîte TATA, serait quant à elle reconnue par des sous-unités de TFIID (Burke and Kadonaga, 1997). La présence combinée de ces différentes séquences au niveau du promoteur est importante pour initier la transcription (Gershenson and Ioshikhes, 2005) (Figure 3).

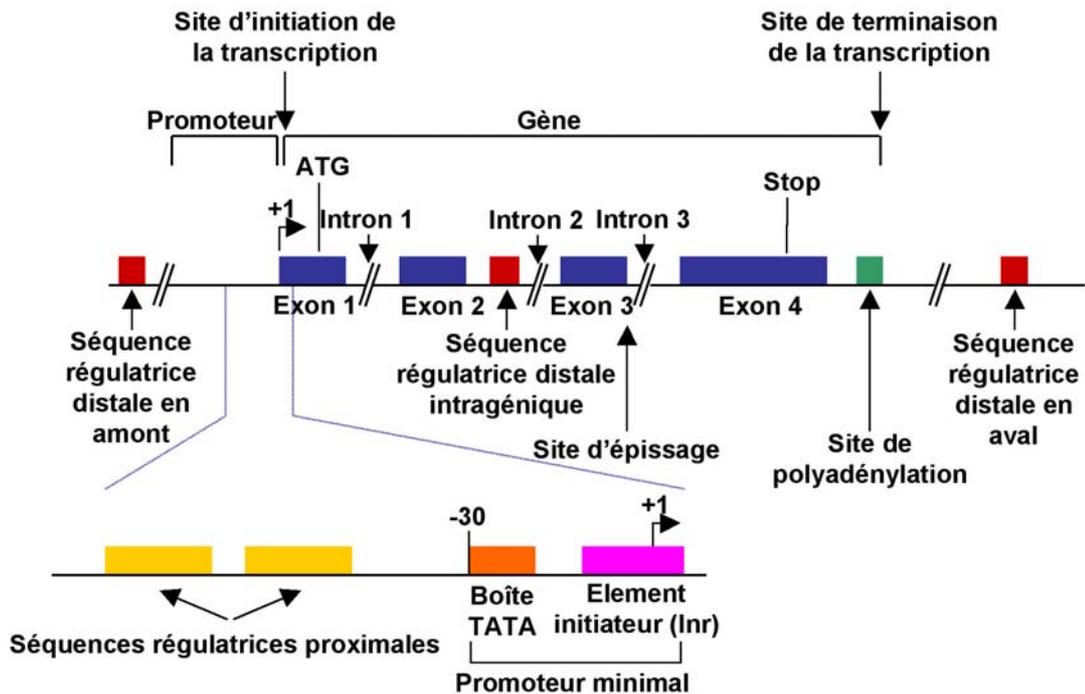


Figure 3 : Représentation schématique des différentes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de la transcription (promoteur, séquences régulatrices proximales et distales), ou dans la maturation des ARN (sites d'épissage et de polyadénylation des ARN). Les trinucléotides « ATG » et « stop » codent pour l'initiation et l'arrêt de la traduction de la protéine, respectivement.

2.1.2 – Les éléments de régulation

Bien que toutes les cellules possèdent la même information génétique, le niveau d'expression de chaque gène diffère de l'une à l'autre. Les gènes possèdent ainsi dans leur promoteur des séquences régulatrices qui leur sont propres et qui autorisent le contrôle de leur expression par des protéines régulatrices. Ces séquences permettent d'adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins physiologiques et à l'état de différenciation des cellules.

Les éléments de régulation ont été classés en deux types, selon leur distance par rapport au site d'initiation de la transcription : les séquences régulatrices proximales et les séquences régulatrices distales.

2.1.2.1 – 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 soit *Upstream Activating Sequence*) ou **répresseur** (URS ou *Upstream Repressing Sequence*) selon la protéine qui les reconnaît. Plusieurs séquences sont maintenant bien caractérisées, comme les **boîtes CAAT** et les **motifs riches en GC**. Des protéines vont pouvoir reconnaître spécifiquement ces séquences et réguler la transcription en contactant la machinerie de transcription de base. Par exemple, les activateurs transcriptionnels de la famille de CTF (*CAAT box Transcription Factor*) reconnaissent la séquence CAAT (Belikov et al., 2004; Gronostajski, 2000), et l'activateur Sp1 se fixe sur les

motifs riches en GC (Gill et al., 1994 ; Lee et al., 2005) afin de recruter la machinerie de base de la transcription.

2.1.2.2 – Les séquences régulatrices distales

Certaines séquences d'ADN sont parfois situées jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases du promoteur pour contrôler l'expression d'un gène. Ces séquences sont appelées « **enhancer** » lorsqu'elles sont activatrices et « **silencer** » lorsqu'elles sont inhibitrices.

Un exemple classique du rôle de séquences régulatrices distales provient de l'étude de l'expression du gène de la β globine. Son expression est contrôlée, au moins en partie, par une région située 20 à 30 kb en amont et nommée LCR, pour la région de contrôle du locus (Fraser and Grosveld, 1998 ; Vakoc et al., 2005).

Trois modèles coexistent pour expliquer la régulation de la transcription par ces séquences (Tang et al., 2002).

Un premier modèle, appelé « **looping** », suggère que l'ADN se courbe et forme une boucle pour permettre aux activateurs fixés sur les régions régulatrices de contacter les facteurs de base de la transcription.

Un deuxième modèle, appelé « **linking** », suggère que les régions de contrôle permettent d'établir une structure chromatinienne (activatrice ou inhibitrice) qui se propage jusqu'au gène à réguler (Bulger and Groudine, 1999).

Le troisième modèle, appelé « **sequential** », suggère que les domaines de régulation permettent la **relocalisation du gène** dans une région du noyau riche en facteurs déstabilisants pour la compaction de la chromatine, et l'activation de la transcription du gène (Francastel et al., 2001 ; Tang et al., 2002).

Le génome compte ainsi de multiples séquences d'ADN qui participent à la régulation de l'expression des gènes. Pour être fonctionnelles, ces séquences d'ADN doivent être reconnues par leurs cibles protéiques. Ceci implique, comme nous le verrons dans le chapitre 3, que ces séquences soient situées dans des régions de la chromatine suffisamment décondensées pour être accessibles aux différentes protéines.

2.2 – Modèles d'assemblage des différents facteurs dits «généraux» de la transcription

L'ARN polymérase II n'est pas capable, seule, de reconnaître le promoteur puis de démarrer la synthèse d'ARN. L'initiation de la transcription *in vitro* nécessite la présence de facteurs auxiliaires, appelés **facteurs généraux de la transcription**, tels TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (Orphanides et al., 1996). L'ARN polymérase II et les facteurs généraux de la transcription (GTFs) constituent la machinerie transcriptionnelle de base qui est la cible d'activateurs ou de répresseurs modulant le taux d'expression de chaque gène en réponse à des signaux divers.

2.2.1 – L'acteur principal de la transcription, l'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II représente la sous-unité catalytique du PIC (*PreInitiation Complex*), bien conservée de la levure à l'homme. Il s'agit d'un **complexe multiprotéique** de 0,5 MDa composé d'une douzaine de sous unités, nommées **RBP** (pour « *RNA Polymerase B* »).

La résolution de la **structure de la polymérase II** seule (Cramer et al., 2000) ou en complexe avec l'ADN et l'ARN (Gnatt et al., 2001) a révélé l'arrangement des sous-unités entre elles, ainsi qu'affiné les mécanismes d'élongation de la chaîne d'ARN. La structure globale de l'ARN polymérase II ressemble à une sorte de mâchoire formée par la sous-unité Rbp1 en haut et par Rbp2 en bas. Le site actif de l'ARN polymérase II seule est localisé au fond de la cavité, fermée à une extrémité par un domaine nommé «mur». Un module flexible qui pivote autour du centre actif, la «pince», a également été visualisé grâce à la cristallographie.

Des différences conformationnelles ont été détectées entre le site actif de l'ARN polymérase II seule et celui de l'ARN polymérase II complexé avec l'ADN/ARN. Dans la polymérase en élongation, la position du domaine en pince délimite un côté du site actif. Ce site se retrouve alors reserré, ce qui ne permet pas d'abriter la structure double brin d'ADN. Par contre, dans l'enzyme libre, la pince s'éloigne du reste de la structure de la polymérase, créant alors une cavité qui peut en théorie lier l'ADN double brin. Ces observations ont inspiré un modèle qui propose que le mouvement du domaine en pince permet le passage de l'enzyme d'une conformation « initiation » à une conformation « élongation », plus serrée, permettant une plus grande processivité de l'ARN polymérase.

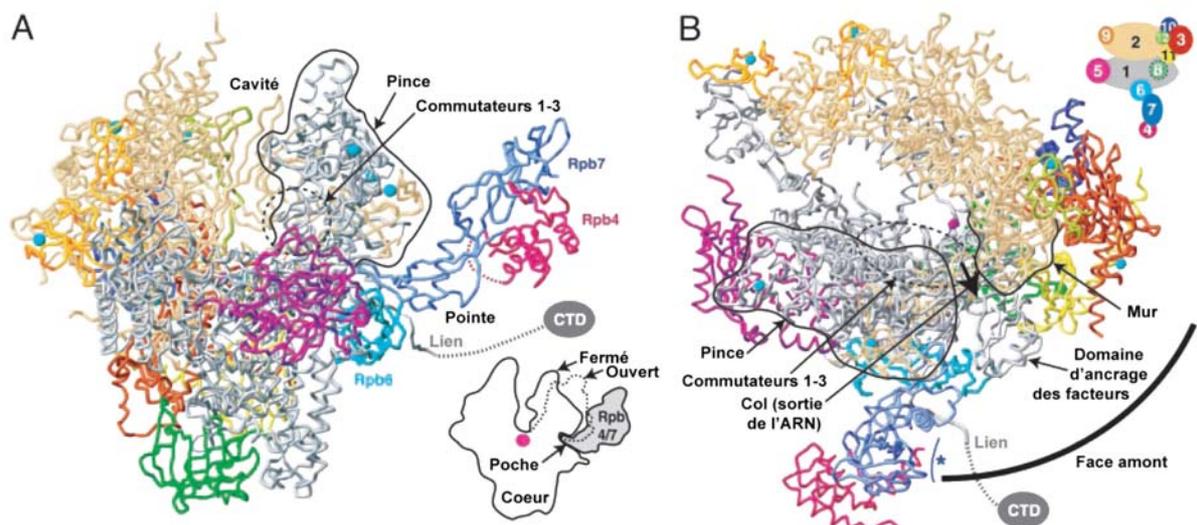


Figure 4 : Structure de l'ARN polymérase II d'après (Cramer et al., 2000) : 12 sous-unités de l'ARN polymérase II couplées à Rpb7/Rpb4.

A – Les sphères bleues et roses représentent les ions zinc et un site de magnésium actif, respectivement. Un cercle noir entoure la pince. Le lien avec le CTD est représenté en ligne pointillée. En bas, à gauche, une vue schématisée est représentée : la ligne pointillée représente la position ouverte de la pince.

B – Autre vue de l'ARN polymérase II : surface d'interaction en amont. Le segment circulaire est centré sur le site actif, et a un rayon qui correspond à la distance minimale entre la boîte TATA et le site de démarrage de la

transcription. L'astérisque bleu indique une potentielle face d'interaction avec Rpb7. La correspondance entre les sous-unités et les couleurs est représentée au niveau du coin en haut à gauche.

La plus grande sous-unité de la polymérase II comprend un domaine carboxy-terminal, le **domaine CTD**, composé d'une séquence répétée de 8 acides aminés Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Ce domaine est spécifique à la polymérase II et joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription, ainsi que dans la coordination des fonctions de maturation de l'ARNm (addition de la coiffe en 5', épissage, ou encore addition de la queue de polyA). Ce domaine peut être phosphorylé par des kinases spécifiques sur les sérines 2 et 5 au cours des différentes phases de la transcription. On le considère comme une **plateforme** qui peut adopter différentes conformations et lier divers facteurs selon son degré de phosphorylation. Lors de l'incorporation de la polymérase II au PIC, le CTD est hypophosphorylé, puis phosphorylé au niveau de sa sérine 5 durant l'initiation de la transcription. La phosphorylation au niveau du CTD permettra ensuite le recrutement des facteurs de maturation de l'ARNm, des facteurs d'élongation et de terminaison de la transcription (Sims et al., 2004; Svejstrup, 2004).

Les modifications au niveau du domaine CTD de la polymérase II semblent indispensables au déroulement de la transcription ainsi qu'au couplage transcription/maturation des ARNm.

L'ARN polymérase II constitue la sous-unité catalytique du PIC, mais également, grâce à son domaine CTD, une structure pouvant intégrer divers signaux essentiels au bon déroulement de la transcription.

2.2.2 – Modèle séquentiel de l'assemblage du PIC

In vitro, les GTFs sont capables de s'assembler sur une séquence promotrice dans un ordre déterminé pour former un complexe de préinitiation (ou PIC) qui va recruter l'ARN polymérase II. Ces découvertes sont à la base du modèle d'assemblage séquentiel du PIC, qui est sérieusement controversé actuellement. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine reflétant l'assemblage de protéines au niveau de promoteurs *in vivo* ont conduit à mettre en doute l'ordre dans lequel les protéines sont assemblées dans ce modèle, puis surtout de démontrer que cet ordre peut varier en fonction de différents promoteurs (Featherstone, 2002).

Les grandes étapes de ce modèle d'assemblage seront brièvement décrites (Figure 5).

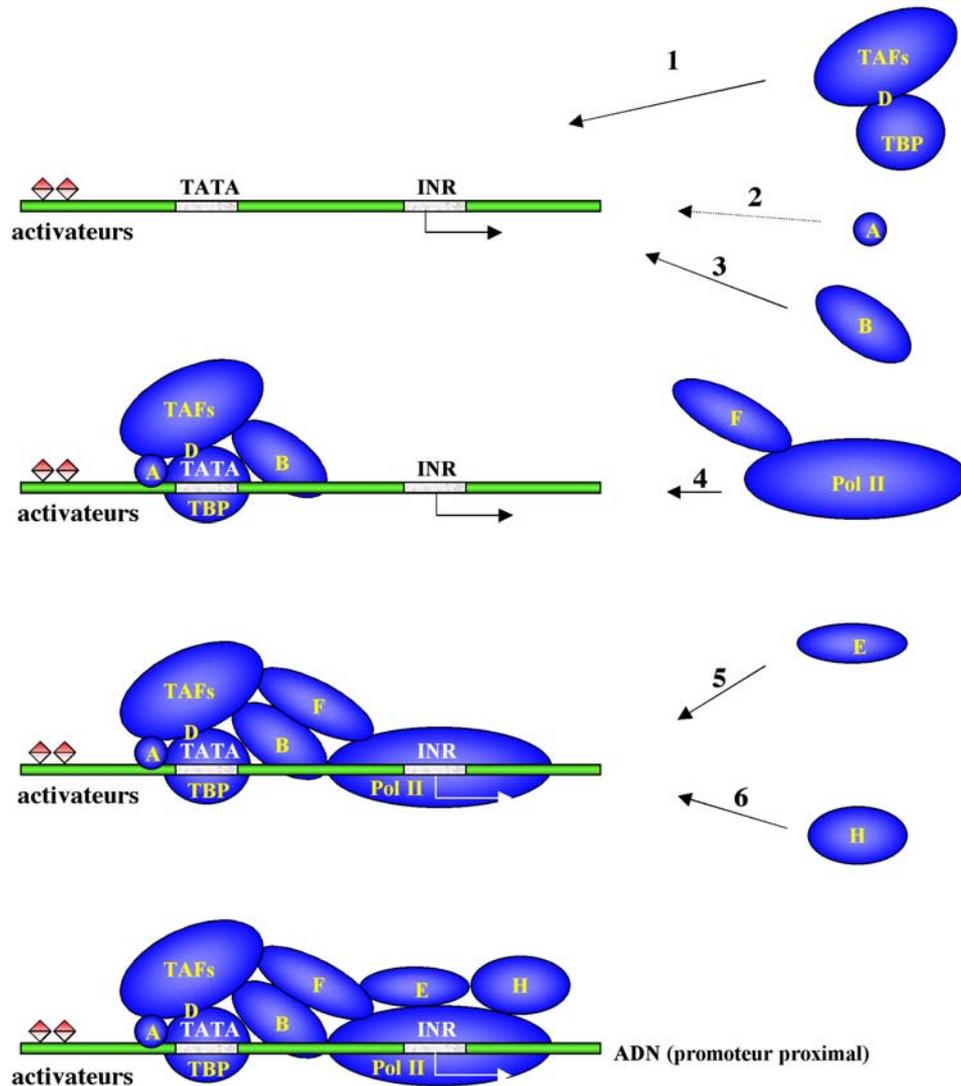


Figure 5 : Modèle séquentiel d'assemblage du PIC *in vitro*, sur un promoteur contenant une boîte TATA

Les lettres désignent les facteurs généraux de transcription (GTF). Les différentes étapes sont décrites dans le texte. TATA : boîte TATA ; Inr : Initiateur.

2.2.2.1 – Reconnaissance du promoteur minimal par TFIID

L'étape initiale de la formation du PIC est la reconnaissance du promoteur.

Soit le promoteur est pourvu d'une boîte TATA, auquel cas il est reconnu par le complexe TFIID (voir chapitre 4.4) et plus particulièrement par la protéine TBP. En se fixant sur l'ADN, TBP crée une courbure de l'ADN d'environ 90° (Burley, 1996 ; Pugh, 2000) qui permet d'une part le rapprochement des séquences situées en amont de celles situées en aval de la boîte TATA et d'autre part la nucléation de l'ouverture des deux brins d'ADN.

Soit le promoteur est dépourvu de boîte TATA, auquel cas on pense que les protéines associées à TBP, les TAFs (*TBP Associated Factors*) peuvent faciliter la liaison de TFIID au

promoteur grâce à des contacts directs avec l'ADN au niveau des éléments INR et DPE (Chalkley and Verrijzer, 1999).

Le complexe TFTC identifié au laboratoire, dépourvu de TBP pourrait également être impliqué dans la reconnaissance de promoteurs sans boîte TATA (voir chapitre 4.5.4).

2.2.2.2 – Reconnaissance du complexe TFIID/promoteur par TFIIA

Le complexe TFIIA vient stabiliser la liaison ADN/TFIID en interagissant directement avec l'ADN en amont de la boîte TATA. TFIIA ne semble pas toujours nécessaire à la formation du PIC *in vitro* : la dépendance à TFIIA dépendrait de la pureté des facteurs utilisés. Ainsi, plus le système de transcription est pur, moins TFIIA semble nécessaire, suggérant que ce facteur neutralise des répresseurs présents dans la réaction (Kaiser and Meisterernst, 1996). TFIIA semble également être la cible de nombreux coactivateurs (Jacobson and Tjian, 1996; Ozer et al., 1998).

2.2.2.3 – Reconnaissance du complexe TFIID/TFIIA/promoteur par TFIIB

TFIIB est capable de reconnaître le complexe TFIID/TFIIA/promoteur et de se fixer à TBP (Nikolov et al., 1995). Il interagit aussi bien avec TBP qu'avec les séquences d'ADN situées en amont et en aval de la boîte TATA (Reese, 2003). La majeure partie de TFIIB se retrouve en aval de la boîte TATA créant alors une asymétrie qui pourrait être responsable de l'ancrage du PIC et de l'orientation de la transcription en direction du site d'initiation (Tsai and Sigler, 2000). Des études sur la levure appuient ce modèle, puisque des mutations dans le gène TFIIB entraînent un déplacement du site d'initiation de la transcription (Wu and Lis, 1994). D'autre part, TFIIB subit des modifications conformationnelles lorsqu'il est assemblé avec TBP sur l'ADN (Fairley et al., 2002).

2.2.2.4 – Recrutement du complexe TFIIF/ARN pol II

L'ARN polymérase II s'associe alors au complexe en formation conjointement à TFIIF (Zawel et al., 1995). TFIIF serait responsable du positionnement correct de la polymérase en réduisant les interactions non spécifiques de celle-ci avec l'ADN (Conaway and Conaway, 1993). TFIIF favorise l'enroulement de l'ADN, sur près d'un tour, autour de l'ARN polymérase II (Robert et al., 1998). TFIIF est capable de se lier à l'ADN entre la boîte TATA et le site d'initiation (Coulombe et al., 1994). Il peut également se lier à de nombreux partenaires protéiques, dont TFIIB, TBP, TAF1 et TAF5, ce qui semble nécessaire à l'initiation de la transcription (Dubrovskaya et al., 1996). TFIIF semble également impliqué dans l'étape de transition entre l'initiation et l'élongation en inhibant un arrêt prématuré de la polymérase (Yan and Gralla, 1997), ainsi que dans l'élongation de la transcription en stabilisant la polymérase.

Diverses fonctions ont ainsi été mises en évidence pour le facteur général de transcription TFIIF. Notons que les activités de cette protéine peuvent être régulées par de

nombreuses modifications post-traductionnelles. Ce facteur peut en effet être acétylé (Imhof et al., 1997), phosphorylé par la kinase associée à TFIIF (Choi et al., 2004; Yankulov and Bentley, 1997), ou par TAF1 (Dikstein et al., 1996), ou s'autophosphoryler (Rossignol et al., 1999).

2.2.2.5 – Liaison de TFIIE et TFIIF au PIC alors complet

TFIIE rejoint le complexe en formation par des interactions avec la polymérase, TFIIF et TBP/TFIID (Langelier et al., 2001; Orphanides et al., 1996). TFIIE recrute alors le complexe TFIIF (Maxon et al., 1994), complétant la formation du PIC.

Le complexe TFIIF prend une place importante parmi les GTFs. En effet, plusieurs activités enzymatiques ont été associées à ce complexe. Celui-ci est composé de deux sous-complexes, le cœur et le complexe kinase-cycline-dépendant (CAK). Le cœur est composé d'une ADN hélicase dépendante de l'ATP, Xeroderma Pigmentosum B (XPB), p34, p52, p62 et p44 qui interagit avec XPD, une l'hélicase ADN/ARN (Xeroderma Pigmentosum D). Le complexe CAK inclut une kinase dépendante de la cycline (Cdk7), accompagnée de la cycline H et de la protéine MAT1.

Les activités hélicases jouent un rôle majeur dans la formation du complexe ouvert lors de l'initiation de la transcription. La kinase Cdk7, quant à elle, est responsable de phosphoryler le domaine CTD de l'ARN polymérase II, ce qui stimule l'élongation de la transcription. Outre son rôle dans la transcription en tant que facteur de base, le complexe TFIIF est aussi impliqué dans la régulation de la transcription (Zurita and Merino, 2003). D'autre part, ce complexe n'est pas uniquement impliqué dans la transcription, mais également dans la réparation par excision de nucléotides (NER), preuve d'une connexion moléculaire entre la machinerie de transcription et la machinerie de réparation.

2.2.3 – Modèle de l'holoenzyme

Le modèle d'assemblage séquentiel du PIC est issu d'expériences réalisées *in vitro* et ne reflète certainement pas les événements réels de l'initiation de la transcription *in vivo*.

Après la copurification d'un grand nombre de régulateurs de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN avec la polymérase II, un autre modèle a été proposé selon lequel la totalité des facteurs impliqués dans la transcription serait associée avec la polymérase II au sein d'un **complexe holopolymérase II** (Parvin and Young, 1998). Dans ce modèle dit de « l'holoenzyme », tous les facteurs seraient recrutés en une seule étape sur les promoteurs des gènes (Orphanides et al., 1996).

Cependant, le complexe TFIIF ainsi que le complexe Médiateur ne sont pas retrouvés dans les différentes préparations d'holoenzyme, remettant en cause ce modèle. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine menées à la fois chez la levure et chez les mammifères ont définitivement écarté ce modèle du fait de la présence de différents types de facteurs ne coexistant pas simultanément sur le même promoteur (Memedula and Belmont, 2003; Metivier et al., 2003).

2.2.4 – Intermédiaire entre les deux modèles d'assemblage du PIC

Le modèle actuel combine le modèle séquentiel et le modèle de l'holoenzyme. Il semble en effet que certains facteurs de base, mais pas tous, soient associés à la polymérase II avant sa liaison sur le promoteur (Hampsey and Reinberg, 1999).

L'ordre de fixation des facteurs au niveau du promoteur semble également pouvoir être modifié selon le contexte. D'une manière logique, il a été proposé que les cofacteurs responsables du remodelage de la structure de la chromatine se lient au promoteur avant les facteurs de base de la transcription, de manière à faciliter l'accès à l'ADN. Cependant, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont conduit à remettre en cause ce point de vue. Les composants de la machinerie transcriptionnelle de base peuvent promouvoir le remodelage de la chromatine et réciproquement (pour revue, (Featherstone, 2002)). La limite entre facteurs de base de la transcription et cofacteurs est devenue un peu floue. Le bon déroulement de l'initiation de la transcription est le résultat d'une dynamique d'assemblage très subtile d'une panoplie de facteurs qui dépend sans doute du contexte du promoteur.

2.3 – Déroulement de l'initiation de la transcription

2.3.1 – L'ouverture de l'ADN ou « bulle » de transcription et l'allongement de la bulle

Au moment de l'association des facteurs d'initiation, l'ADN se trouve dans une conformation double brin. Après l'assemblage des différents facteurs, l'ADN est ouvert entre les positions -9 et +2, grâce aux activités hélicase de TFIIF. L'initiation de la synthèse de la chaîne d'ARN débute par la formation de la première liaison phosphodiester qui aboutit à la formation d'un dinucléotide. Au cours de l'assemblage des premiers nucléotides, le complexe d'élongation est instable et l'on peut observer de nombreuses synthèses avortées. Un complexe stable n'est obtenu qu'après la formation du produit de 4 nucléotides. Par la suite, la bulle s'étend tandis que l'ARN s'allonge jusqu'à la position +9 (Holstege et al., 1997).

2.3.2 – Le relargage des facteurs d'initiation, simultanément au recrutement des facteurs d'élongation

Le passage de l'initiation de la transcription à l'élongation est appelée « échappée » du promoteur. Durant cette étape, la bulle de transcription atteint le nucléotide situé en position +11 et la région -9 à +2 de l'ADN ré-adopte la conformation double brin. La phosphorylation du domaine CTD de la polymérase semble être l'événement-clé marquant la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription. Cette phosphorylation pourrait déstabiliser les interactions entre l'ARN polymérase II et les facteurs d'initiation. En effet, TBP et TFIIE interagissent préférentiellement avec la forme non phosphorylée du CTD (Usheva et al., 1992).

La réaction d'initiation se termine par le départ des facteurs d'initiation de la bulle de transcription (Holstege et al., 1997). Certains facteurs de transcription peuvent être cependant maintenus au niveau du promoteur (TFIID, TFIIE et TFIIH) par des activateurs transcriptionnels (Yudkovsky et al., 2000), constituant alors une marque pour faciliter la ré-initiation de la transcription.

2.4 – Elongation et terminaison de la transcription

Cette étape est hautement régulée et fait intervenir de nombreux facteurs ayant soit un effet positif, soit un effet négatif sur la transcription (Svejstrup, 2004). Seuls quelques exemples de facteurs d'élongation sont décrits dans ce travail, selon leurs fonctions présumées.

2.4.1 – Présentation de quelques facteurs qui stimulent l'élongation de la transcription par phosphorylation du CTD

La phosphorylation du CTD est nécessaire à l'élongation de la transcription. En effet, les kinases **CTDK-1** (*Carboxy Terminal Domain Kinase 1*), **cdk7** (kinase présente dans le complexe TFIIH) et **p-TEFb** (*Positive Transcription Elongation Factor b*) stimulent l'élongation du transcrit, alors que des inhibiteurs de kinase freinent l'élongation de la transcription *in vitro* et *in vivo* (Marshall and Price, 1995). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré une différence entre la phosphorylation de la Ser2 et de la Ser5 du motif répété au cours de la transcription : la Ser5 est principalement phosphorylée lors de la transition entre l'initiation et l'élongation alors que la Ser2 l'est au moment de l'élongation (Cho et al., 2001 ; Palancade and Bensaude, 2003). Cela montre que le processus de phosphorylation du CTD est hautement régulé durant les différentes phases de la transcription.

2.4.2 – Stabilisation de la polymérase sur l'ADN

La vitesse de l'ARN polymérase *in vitro* (100-300 nucléotides/minute) est bien inférieure à la vitesse observée *in vivo* (1200-2000 nucléotides/minute). La polymérase peut en effet s'arrêter ou revenir en arrière. Le facteur d'élongation **TFIIF** s'associe directement à l'ARN polymérase II, empêchant alors l'arrêt de la polymérase II au niveau des sites de pauses transitoires (Aso et al., 1995). Certains facteurs, comme la présence des protéines ELL ou bien de l'élongine, peuvent également augmenter la vitesse de la polymérase (Reines et al., 1996).

2.4.3 – Reprise de la transcription après l'arrêt de la polymérase

Le facteur d'élongation **TFIIS** interagit avec la grande sous-unité de l'ARN polymérase II et permet de reprendre l'élongation grâce à un mécanisme impliquant le clivage de l'ARN synthétisé, puis sa resynthèse (Conaway et al., 2003). La structure de TFIIS associé

à l'ARN polymérase II a été résolue par cristallographie aux rayons X. C'est ainsi que l'on a compris que la liaison de TFIIS provoque des modifications structurales importantes au niveau de l'ARN polymérase II, lesquelles modifications favoriseraient une structure de la polymérase à l'imitation de celle observée lors de l'étape d'élongation (Kettenberger et al., 2003 ; Kettenberger et al., 2004). Ces travaux n'ont toutefois pas permis de mettre en évidence le mécanisme de clivage de l'ARN par TFIIS.

2.4.4 – Facteurs favorisant l'arrêt de la polymérase

En l'absence de pTEFb, deux facteurs négatifs d'élongation, **DSIF** (*DRB Sensitivity Inducing Factor*) et **NELF** (*Negativ Elongation Factor*) s'associent à l'ARN polymérase II et s'opposent à sa progression au delà de quelques nucléotides après le site d'initiation (Sims et al., 2004). La phosphorylation du CTD par p-TEFb favorise la dissociation de DSIF et NELF de l'ARN Pol II.

2.4.5 – Importance de l'environnement créé par la chromatine

La chromatine peut constituer un obstacle au positionnement et à la liaison de protéines spécifiques au niveau de régions particulières de l'ADN (voir chapitre 3). Lors de l'élongation, l'ARN polymérase doit avoir accès à l'ADN, ce qui nécessite des modifications locales au niveau de la structure de la chromatine.

In vitro, un nucléosome entier peut être transféré en amont de la polymérase pour faciliter son passage (Felsenfeld et al., 2000). *In vivo*, les histones sont toujours associées avec l'ADN des gènes transcrits, ce qui suggère que l'octamère d'histone ne quitte pas l'ADN durant le processus d'élongation. Divers facteurs protéiques aident à la progression de l'ARN polymérase II lors de l'étape de l'élongation du transcrite en modifiant la structure de la chromatine.

Par exemple, le **complexe SWI/SNF** facilite la transcription par l'ARN polymérase II, sans doute en altérant les interactions entre les nucléosomes et l'ADN (Narlikar et al., 2002). Toutefois, ce complexe semble également doté d'un effet répressif sur la transcription (Martens and Winston, 2002).

Au moment où la polymérase réalise la transcription, les nucléosomes sont transitoirement déplétés en histones H2A-H2B (Nacheva et al., 1989) et leur position est souvent modifiée (Hartzog et al., 2002). Il est un autre complexe qui facilite l'élongation de la transcription par la polymérase II dans le contexte de la chromatine : le **complexe FACT** (*Facilitates Chromatin Transcription*). Des études biochimiques laissent entendre que FACT interagit spécifiquement avec les histones H2A et H2B. Or, lorsque des pontages covalents sont réalisés entre les histones d'un nucléosome, l'activité de FACT est inhibée. Ainsi le complexe FACT peut altérer les nucléosomes pendant l'élongation en liant et en ôtant au nucléosome les histones H2A et H2B (Orphanides et al., 1999 ; Sims et al., 2004).

Parmi les protéines qui facilitent l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II, on retrouve le complexe Elongator, doué d'**activité HAT** (*Histone Acetyl Transferase*) (Sims et al., 2004; Wittschleben et al., 1999). Or, les régions transcrites sont souvent hyperacétylées *in vivo*. L'acétylation des histones pourrait restructurer la chromatine, facilitant alors l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II. Nous verrons dans la

suite de ce travail que nombreux sont les coactivateurs de la transcription dotés de ce type d'activité enzymatique HAT.

2.4.6 – Terminaison de la transcription

L'arrêt de l'élongation nécessite la présence d'un signal de polyadénylation fonctionnel (AAUAA) sur l'ARN, qui sera reconnu par le **facteur CPSF** (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*). Ceci entraîne un changement de conformation qui induit directement un arrêt de la transcription par l'ARN polymérase II (Osheim et al., 1999). L'étape de terminaison de la transcription est en fait couplée aux autres étapes. En effet, la protéine CPSF peut être associée à TFIID, d'où on déduit que l'ARN polymérase II doit s'associer avec les facteurs de clivage bien avant l'étape de terminaison de la transcription (Dantonel et al., 1997). En outre, un défaut de la phosphorylation du CTD conduit à une terminaison défectueuse de la transcription, ce qui montre que la phosphorylation du CTD importe à chaque étape de la transcription.

Enfin, bien que le mécanisme de dissociation du complexe ternaire RNAPII/DNA/RNA ne soit pas totalement élucidé, la structure de la chromatine dans la région de terminaison joue un rôle clé dans la terminaison. Il a notamment été démontré chez la levure, que les protéines capables de remodeler la chromatine en présence d'ATP sont impliquées dans la terminaison de la transcription. A défaut de pouvoir expliquer le mécanisme qui conduit à la terminaison de la transcription, on sait maintenant que ce processus s'inscrit dans la continuité des autres étapes de la transcription.

3 – L'ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION : IMPORTANCE DE L'ENVIRONNEMENT CREE PAR LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE

3.1 – Brève introduction sur les activateurs de la transcription

3.1.1 – Quelques mécanismes d'action des activateurs

De nombreuses équipes ont proposé que les activateurs de la transcription, après s'être liés à l'ADN, soient impliqués dans le recrutement de la machinerie de base conduisant à l'initiation de la transcription (Struhl, 1996). Leurs expériences ont été réalisées *in vitro* sur de l'ADN nu auquel ont été ajoutés les facteurs de transcription purifiés.

In vivo, la transcription peut être inhibée par la chromatine, structure compacte qu'il faut ouvrir afin de permettre aux différents facteurs protéiques de reconnaître l'ADN et de s'y fixer.

De nombreuses équipes de chercheurs ont alors suggéré que les activateurs agissent en déstabilisant et/ou en modifiant localement la chromatine pour activer la transcription. L'activateur lié à l'ADN peut recruter des enzymes responsables du changement de la structure de la chromatine, parmi lesquelles les enzymes capables d'acétyler les histones ou les protéines capables de remodeler la chromatine en présence d'ATP (pour revue, (Dilworth and Chambon, 2001) (voir chapitres 3.4.2 et 3.3.2).

Enfin, il a été proposé que les activateurs agissent en contrôlant la processivité de l'élongation de la transcription.

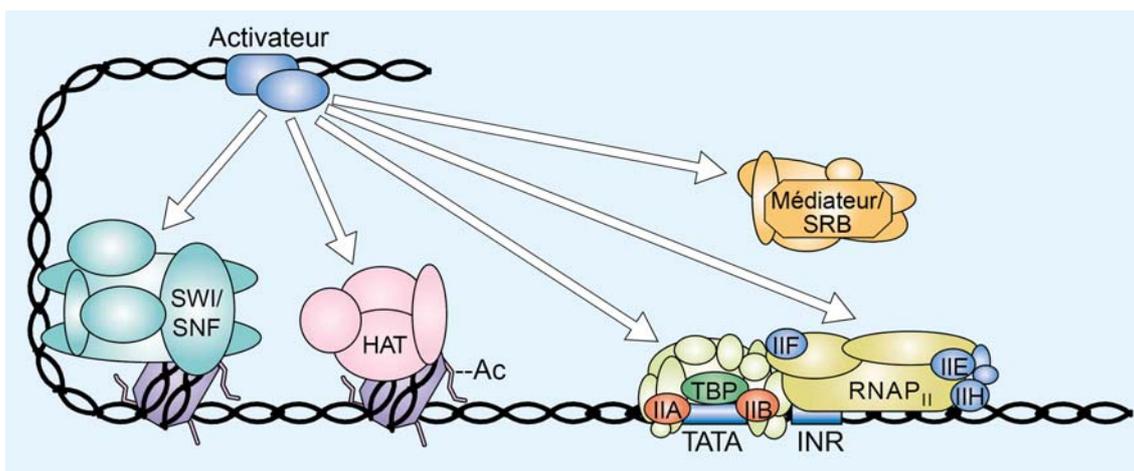


Figure 6 : Les activateurs transcriptionnels se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques et recrutent de nombreux cofacteurs protéiques (Fry and Peterson, 2001)

Sont représentés le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, les HATs, les facteurs généraux de la transcription, les TAFs, l'ARN polymérase II et le complexe Médiateur. De nombreux activateurs sont responsables du recrutement d'une gamme de cofacteurs, mais l'ordre d'intervention de ces cofacteurs n'est pas toujours connu. INR : élément initiateur, Ac : acétylation.

3.1.2 – Quelques exemples d'activateurs transcriptionnels

Les activateurs transcriptionnels possèdent une structure modulaire constituée au minimum d'un **domaine de liaison à l'ADN (DBD)** et d'un **domaine d'activation (AD)**. La plupart des protéines activatrices possèdent en outre un domaine de dimérisation (DD) qui leur permet de s'homo- ou de s'hétérodimériser. Chacun de ces domaines est échangeable avec le domaine correspondant d'un autre activateur (Sadowski et al., 1988)

Un des activateurs les plus employés dans les systèmes de transcription *in vitro* est la protéine de levure GAL4. Les domaines DBD et AD de cet activateur ont largement été utilisés sous forme de fusion avec différents domaines afin de comparer directement l'efficacité d'activation de multiples activateurs dans un système commun.

Les eucaryotes supérieurs possèdent une très grande variété d'activateurs ubiquitaires ou spécifiques de certaines cellules. Citons par exemple la famille des récepteurs nucléaires qui se lie à l'ADN par un domaine en doigt à zinc et qui possèdent deux domaines d'activation : l'un dépend de la liaison par un ligand, l'autre est indépendant (Steinmetz et al., 2001). Cette famille d'activateurs comprend les récepteurs aux hormones thyroïdes, stéroïdes, à la vitamine D et les récepteurs à l'acide rétinoïque (Acevedo and Kraus, 2004; Evans, 1988).

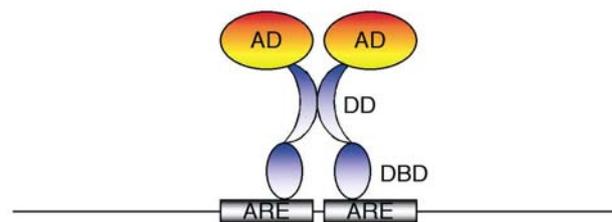


Figure 7 : Représentation schématique d'un activateur proximal

AD : domaine d'activation ; DD : domaine de dimérisation ; DBD : domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît spécifiquement un site de liaison appelé ARE pour « élément de réponse spécifique à l'activateur ».

3.1.3 – Les activateurs ont besoin de cofacteurs pour activer la transcription

On a longtemps pensé que la régulation de la transcription se faisait principalement par l'intermédiaire d'activateurs qui se lieraient à des séquences spécifiques d'ADN. Ces protéines se fixeraient sur des éléments activateurs facilitant alors l'affinité de la machinerie basale de la transcription pour un promoteur spécifique.

Mais le processus de régulation de la transcription s'est révélé plus complexe. Quelques observations ont permis de réaliser que la régulation des gènes ne peut pas s'expliquer simplement par le recrutement de protéines spécifiques. La compaction de l'ADN sous forme de chromatine et la dynamique de la structure chromatinienne peuvent constituer un obstacle pour certaines étapes du processus de transcription dont l'assemblage du

complexe de pré-initiation et l'élongation du transcrit par l'ARN polymérase II. Les facteurs protéiques doivent accéder à l'ADN pour initier la transcription.

La structure de la chromatine est une structure compacte mais dynamique, qu'il faut pouvoir ouvrir au préalable afin que les différents processus cellulaires liés à l'ADN puissent avoir lieu.

3.2 – Implication de la structure de la chromatine dans la régulation de la transcription : contexte répressif mais informatif

Nous avons vu que les activateurs de la transcription peuvent agir en recrutant des enzymes responsables de modifications de la structure chromatinienne.

En effet la structure de la chromatine n'est pas figée mais dynamique : cela semble déterminant pour certaines fonctions du génome comme la transcription, mais aussi pour la réparation et la recombinaison. Outre son rôle structural, elle a la capacité de moduler l'accès des facteurs transcriptionnels aux séquences d'ADN, de participer à la signalisation, et même de transmettre de génération en génération des informations de type épigénétique.

3.2.1 – Structure de la chromatine

3.2.1.1 – Structure du nucléosome

L'unité, le nucléosome, contient 147 pdb d'ADN enroulé environ deux fois autour d'un octamère d'histone. La structure d'un octamère d'histones entouré d'ADN a été déterminée par cristallographie aux rayons X à une résolution de 1,9 Å (Figure 8) (Davey et al., 2002; Luger et al., 1997). Un octamère d'histone se compose de deux copies de chacune des quatre histones, **(H3-H4)₂** au centre, entourées par deux dimères **H2A-H2B** formant alors une structure globulaire. Les queues des histones émergent de cette structure globulaire, et *in vitro*, dans le contexte d'un nucléosome unique, ces extrémités N-terminales ne sont pas figées, mais flexibles. *In vivo*, ces queues d'histones pourraient participer à l'organisation de la chromatine en servant d'intermédiaire d'interaction nucléosomes/protéines chromatinienne et entre les nucléosomes eux-mêmes.

Les nucléosomes ne sont pas des structures inertes, mais adoptent plusieurs transitions conformationnelles. Leur position n'est pas le fait du hasard, mais dépend de la séquence d'ADN. Les nucléosomes peuvent être reliés par l'**histone H1** et cette association a un effet stabilisant sur la structure nucléosomale et sur la structure chromatinienne plus compactée (Carruthers et al., 1998). L'histone H1 est connue pour restreindre la mobilité de chaque nucléosome (Hill and Imbalzano, 2000 ; Horn et al., 2002). Ainsi, lorsque cette histone est déplétée, la structure de la chromatine s'en trouve modifiée, ce qui augmente l'accessibilité de l'ADN.

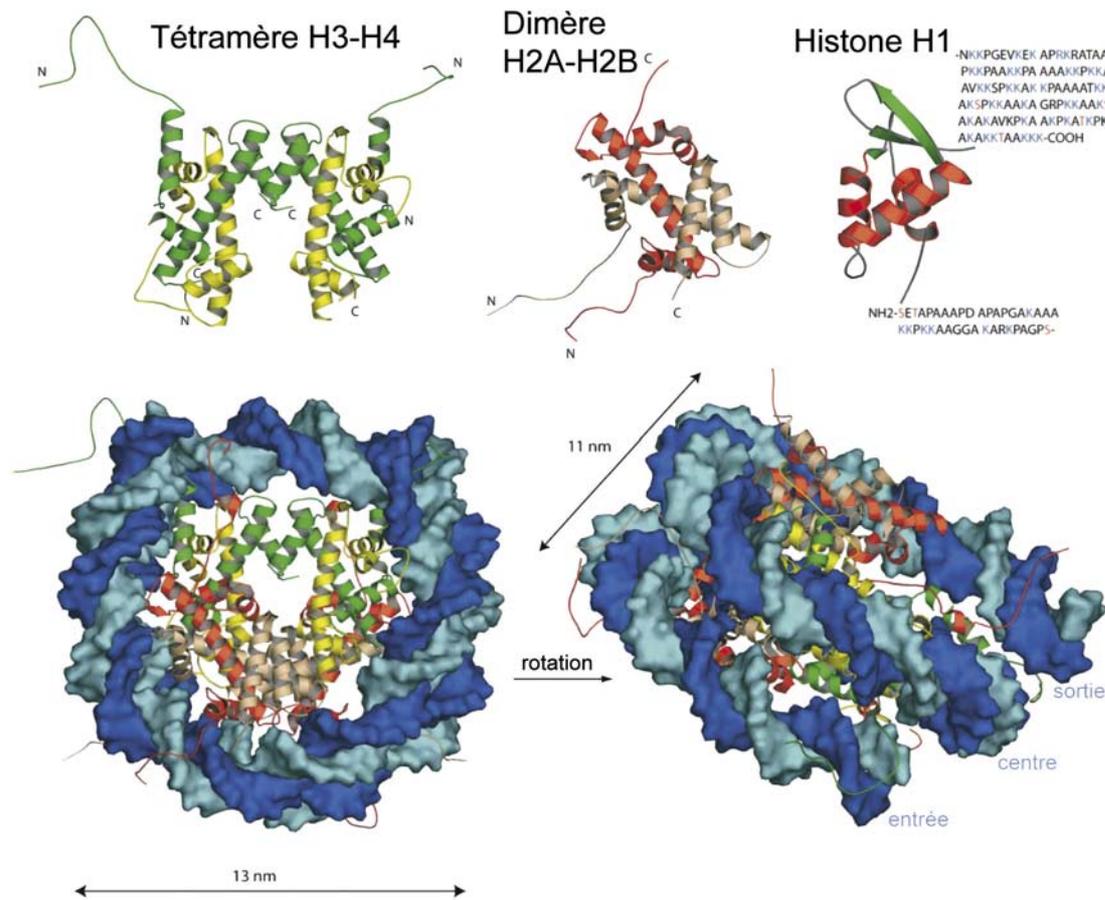


Figure 8 : Structure atomique d'un nucléosome résolue par cristallographie aux rayons X, d'après (Khorasanizadeh, 2004)

Chaque brin d'ADN est représenté d'un bleu différent. L'ADN fait 1,7 tour en s'enroulant autour du nucléosome. En haut, à gauche est représenté le tétramère H3-H4, avec H3 en vert et H4 en jaune. Au centre, en haut est représenté le dimère H2A-H2B, avec H2A en rouge et H2B en rose. Enfin, en haut à droite est représenté l'histone H1 ; les séquences en N-terminal et en C-terminal, non structurées, sont indiquées.

3.2.1.2 – Stabilité des nucléosomes

Les histones s'agencent en nucléosomes de manière très stable *a priori*. Toutefois, des expériences *in vitro* ont montré que **H2A et H2B sont plus mobiles que H3 et H4** et que cette mobilité semble dépendre de la transcription (Jackson et al., 1990 ; Wolffe, 2001). Cette mobilité de l'interaction entre les dimères H2A-H2B et les tétramères (H3-H4)₂ peut contribuer à changer les conformations de nucléosomes observées dans les cellules. En fait, il a été observé que les régions de la chromatine actives en transcription peuvent être déplétées en dimères H2A-H2B qui peuvent être rapidement échangés (Jackson, 1990), ou que certains promoteurs actifs ne contiennent pas de nucléosomes au site +1 (Lomvardas and Thanos, 2002).

Si la structure du nucléosome possède une relative stabilité, elle n'en est pas moins variable au niveau de sa composition.

3.2.1.3 – Les pseudo-nucléosomes

Les TAFs possèdent un motif structural un peu particulier qui ressemble au repliement des histones. Comme certaines TAFs s'associent entre elles, ces protéines pourraient mimer la structure nucléosomale ; on a attribué le nom de « **pseudo-nucléosome** » à cet agencement de TAFs (Hoffmann et al., 1996; Xie et al., 1996). Il est possible que les complexes possédant ce type de structure, comme TFTC ou bien TFIID, puissent remplacer un ou plusieurs nucléosomes sans perturber complètement l'agencement « nucléosomes-ADN ». La liaison de ce complexe mimant la chromatine sur le promoteur maintiendrait le niveau global de compaction de la chromatine.

3.2.1.4 – Assemblage des nucléosomes pour former une structure compacte

Chaque nucléosome est espacé de 10-60 pdb d'ADN résultant en une fibre chromatinienne de 10 nm de diamètre, visualisée *in vitro*. Cet arrangement en collier de perle est encore condensable grâce à des facteurs qui stabilisent les histones sur chaque particule nucléosomale, formant alors la **fibre chromatinienne de 30 nm**.

La structure de cette fibre n'est toujours pas clairement définie et différents modèles de structure ont été proposés.

Le premier modèle propose que les nucléosomes arrangés en collier de perle se condensent pour former une structure en hélice, le solénoïde, ou bien une structure en zig-zag. Un deuxième modèle, plus récent, prévoit que l'hélice puisse être formée à partir de deux sites d'initiation (Dorigo et al., 2004) (Figure 10). Ces modèles ne sont pas contradictoires, on peut imaginer que plusieurs modèles de compaction coexistent *in vivo*. D'ailleurs, des travaux en cryomicroscopie électronique ont montré que les nucléosomes peuvent s'agencer en de multiples structures *in vitro*, résultant en une structure chromatinienne irrégulière (Chakravarthy et al., 2005).

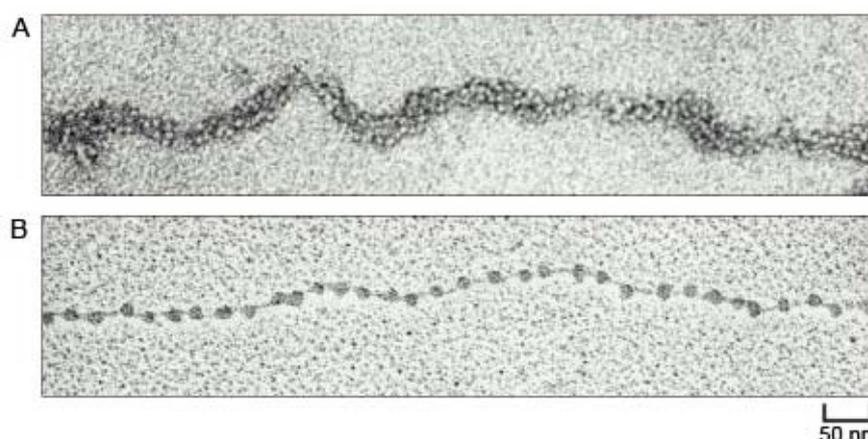


Figure 9 : Images en microscopie électronique de différents agencements ADN-nucléosomes

Les nucléosomes et l'ADN peuvent s'agencer en une structure ouverte, « en collier de perle »(B), ou en une structure plus compacte, la fibre de chromatine de 30 nm (A).

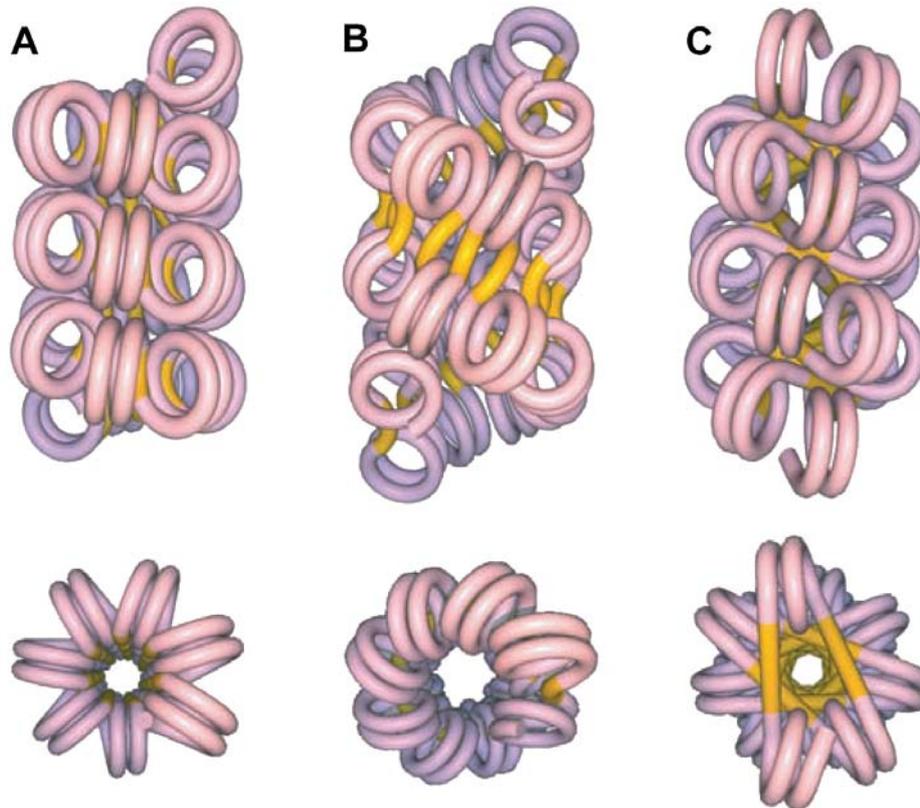


Figure 10 : Modèles d'organisation de la fibre de chromatine, d'après (Dorigo et al., 2004)

- (A) - la structure de la fibre de chromatine est un solénoïde à un site d'initiation
- (B) – structure « supercoiled » à deux sites d'initiation
- (C) – Structure twist à deux sites d'initiation

En haut, l'axe de la fibre est représenté verticalement, tandis qu'en bas la fibre est visualisée avec l'axe au centre. L'ADN associée aux nucléosomes est représenté en rose, et l'ADN seul en jaune.

Ces fibres de 30 nm de diamètre sont ensuite compactées *in vivo* pour former les fibres de 100-400 nm visualisées pendant l'interphase ou encore plus compactée pendant la métaphase (Figure 11) (Chakravarthy et al., 2005). Cette organisation de l'ADN en fibres de chromatine réduit l'accessibilité aux protéines impliquées dans la transcription, d'où l'importance de la mobilité de cette structure.

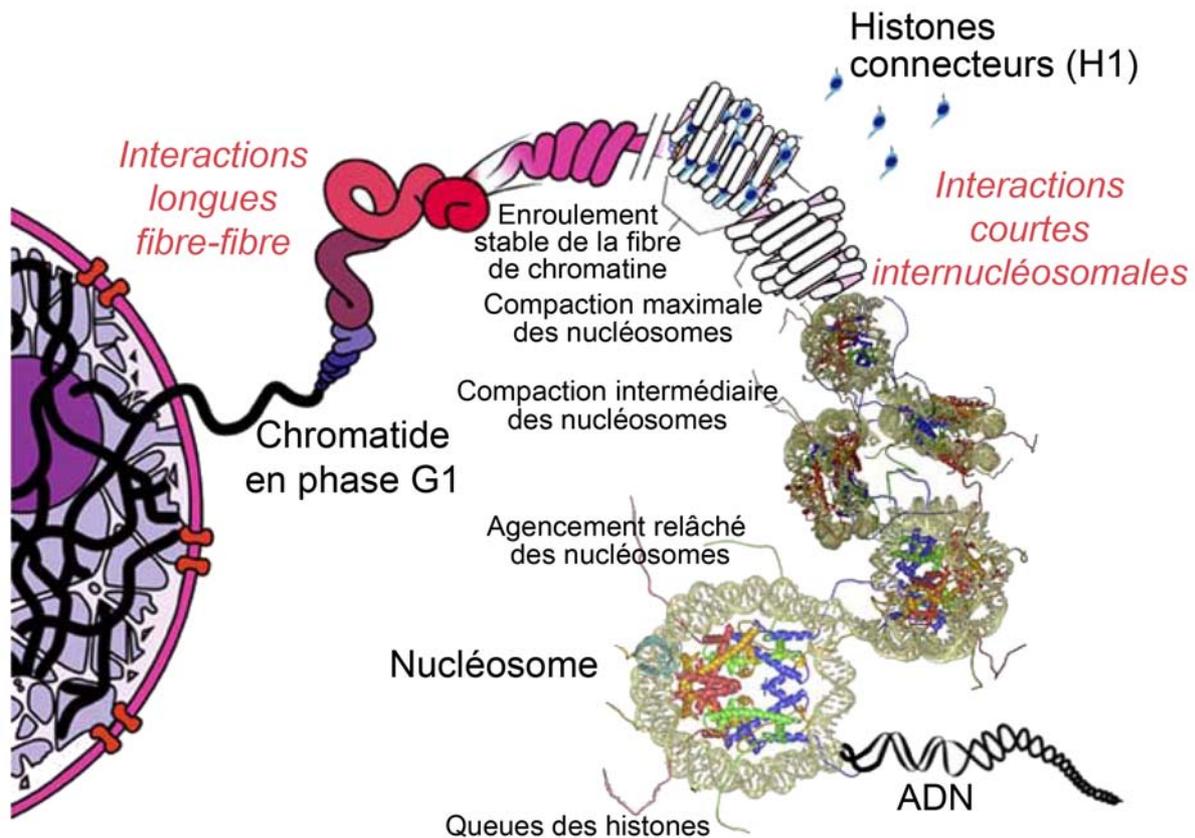


Figure 11 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN, d'après (Chakravarthy et al., 2005)

L'organisation de l'ADN chez les eucaryotes est modulaire. Les divers niveaux de compaction de la chromatine sont représentés schématiquement : chromatine faiblement condensée, puis fortement compactée au niveau de fibres d'architecture encore inconnue.

3.2.2 – Notions d'euchromatine et d'hétérochromatine

Le terme d'hétérochromatine est apparu en 1928 pour décrire un type de chromatine fortement marqué par les techniques de coloration en prophase, et qui reste compacté tout au long de la mitose. A l'inverse, l'euchromatine est la forme décondensée observée lors de l'interphase, qui correspond aux régions actives en transcription (Dimitri et al., 2005).

L'hétérochromatine, moins active au niveau transcriptionnel, se révèle pourtant essentielle à de nombreux processus, comme le maintien de la stabilité du génome. En effet, chez la majorité des eucaryotes, les régions centromériques sont constituées de séquences répétées, compactées en hétérochromatine constitutive, et cette compaction est essentielle à la ségrégation correcte des chromatides-sœurs en mitose. D'autre part, l'hétérochromatine intervient dans la formation des télomères, qui permettent de maintenir l'intégrité des extrémités des chromosomes (pour revue, (Dimitri et al., 2005)).

En outre, l'hétérochromatine constitutive n'est dorénavant plus considérée comme une région inerte, et peut être le siège de gènes activement transcrits (Eissenberg, 2001 ; Eissenberg and Hilliker, 2000 ; Henikoff et al., 2001).

3.2.3 – La chromatine comme support de l'information épigénétique

Les cellules d'un même organisme possèdent le même patrimoine génétique. Or, elles sont capables de se différencier et d'acquérir des fonctions spécifiques. D'où l'idée qu'une information pourrait se transmettre indépendamment de la séquence génétique. On sait maintenant que cette information, dite « épigénétique », est en partie portée par les nucléosomes (Ray-Gallet et al., 2005). Bien que ces mécanismes précis ne soient pas encore élucidés, il apparaît que certaines marques sur les nucléosomes sont stables au cours des mitoses successives. Le maintien de cette information épigénétique constituerait en quelque sorte la garantie d'une mémoire cellulaire.

Ceci montre le rôle considérable de la chromatine, support de l'information épigénétique, dans la régulation de l'expression de l'information génétique.

3.2.4 – Les variants d'histones

La cellule aurait à sa disposition une autre stratégie de modification de la structure de la chromatine : le remplacement de certaines histones par leurs variants isoformes (pour revue, (Henikoff et al., 2004; Kamakaka and Biggins, 2005 ; Sarma and Reinberg, 2005)).

A l'heure actuelle, de nombreux variants des histones ont été isolés ; citons : H3.3, CenH3, H2AZ, H2AX, H2A-Bbd, MacroH2A (Kamakaka and Biggins, 2005).

En bref, **H3.3**, un variant de l'histone H3, est depuis longtemps associé à une activation de la transcription (Ahmad and Henikoff, 2002 ; Chow et al., 2005 ; Schwartz and Ahmad, 2005). Ce variant diffère de H3 par un acide aminé sur la queue N-terminale et par 3 aa dans le domaine de repliement typique des histones (Henikoff et al., 2000 ; Henikoff et al., 2004)}.

Un variant de l'histone H2, **H2A.Z**, se retrouve également au niveau de sites transcriptionnels actifs ; son incorporation dans les nucléosomes les rend plus instables (Redon et al., 2002). Chez *S.cerevisiae*, la fonction de H2A.Z est partiellement redondante avec les complexes ATP-dépendants de remodelage de la chromatine SWI/SNF et avec le complexe Gcn5, lequel porte une activité HAT impliquée dans l'activation de la transcription (Santisteban et al., 2000).

Ainsi, l'incorporation des variants du type H3.3 ou H2A.Z pourrait contribuer à réguler la transcription en modifiant la structure de la chromatine.

C'est un autre variant d'histone qui est décrit dans cette thèse : le **variant H2AX** qui, semble plutôt jouer un rôle dans la réparation de l'ADN. Il possède une région C-terminale, plus longue que H2A, qui est conservée au cours de l'évolution. Cette région est spécifiquement phosphorylée après induction de cassures double-brin de l'ADN (Ward and Chen, 2001) (voir Chapitre 6.2.1.1).

3.2.5 – La structure de la chromatine dynamique

La découverte de nombreux variants d'histones, ainsi que la mise en évidence de structures capables de mimer les nucléosomes, ont permis d'envisager le nucléosome comme une entité variable. Si on ajoute à cela les différents niveaux de compaction de la chromatine

ainsi que les infinies combinaisons de modifications post-traductionnelles qui peuvent s'appliquer sur les histones, on peut imaginer que la structure de la chromatine est très variable et qu'elle prend des conformations multiples.

Il est maintenant clair que la structure de la chromatine est extrêmement dynamique et que les modifications structurales de la chromatine sont hautement régulées. Ainsi la plupart des processus de biologie moléculaire, tels que le cycle cellulaire, la transcription, la réparation et la réplication de l'ADN, vont s'effectuer dans cet environnement chromatinien, ce qui est susceptible d'en modifier sa structure.

La chromatine joue un rôle central dans la plupart des processus de régulation de la cellule, et nous verrons dans la suite de ce travail quelles peuvent être les implications de la structure de la chromatine dans la transcription de l'ADN et dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Nous verrons également comment les facteurs remodelant la chromatine et les enzymes induisant des modifications chimiques au niveau des histones contribuent à réguler l'accessibilité de l'ADN.

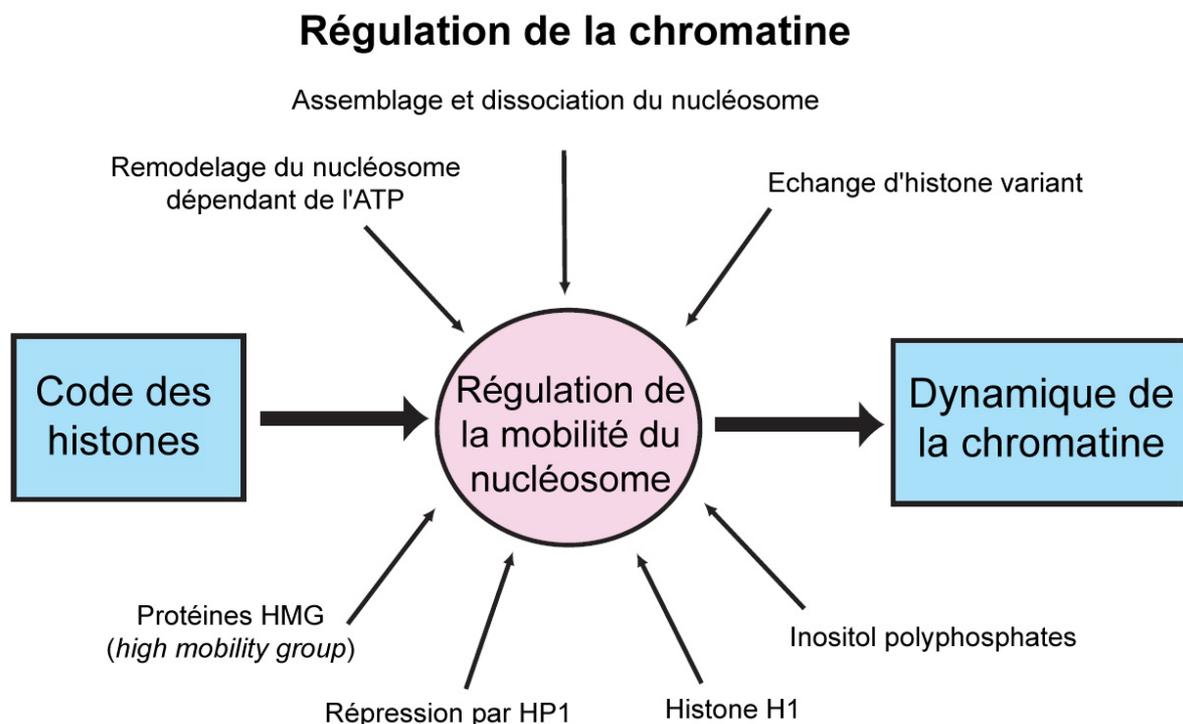


Figure 12 : La chromatine est une structure dynamique, d'après (Cosgrove et al., 2004)

3.3 – Les coactivateurs transcriptionnels contribuent à créer un environnement chromatinien adéquat à la transcription.

3.3.1 – Brève introduction sur les cofacteurs

Le nombre de cofacteurs transcriptionnels découverts a explosé durant ces dix dernières années. Quelques uns de ces cofacteurs ont été reliés à des activités enzymatiques impliquées dans des modifications structurales de la chromatine. D'où la théorie, maintenant

globalement admise, selon laquelle les cofacteurs contrenteraient les effets répressifs de la chromatine.

Divers types de cofacteurs participent à la régulation de l'expression génique, en contribuant soit à l'activation de la transcription (coactivateurs), soit à son inhibition (corépresseurs). Dans cette thèse seront décrits principalement des coactivateurs transcriptionnels. Ceux-ci ont la capacité de s'agencer en complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire (de même que le complexe TFIIIC étudié au laboratoire) et sont impliqués dans un large éventail de fonctions.

Afin de favoriser la transcription d'un gène, les coactivateurs sont doués de divers types d'activités.

Certains coactivateurs agissent en recrutant directement la machinerie de transcription. D'autres coactivateurs sont porteurs d'activités enzymatiques particulières et sont classés en deux catégories :

- certaines enzymes modifient la structure chromatinienne en induisant des modifications covalentes sur la queue N-terminale des histones. C'est le cas des histone acétyl transférases, des histone déacétylases, des kinases, des phosphatases, des ubiquitine ligases, et des histone méthyl transférases (HMG),
- l'autre catégorie d'enzyme remodèle la structure de la chromatine en présence d'ATP (dépendant d'ATP), c'est le cas des complexes SWI/SNF.

Pour établir une structure chromatinienne locale adéquate à l'initiation de la transcription, plusieurs types d'enzymes sont parfois nécessaires. Par exemple, les protéines acétylant les histones et celles qui remodèlent la chromatine dépendamment de l'ATP agissent très souvent conjointement pour permettre une activation de la transcription optimale.

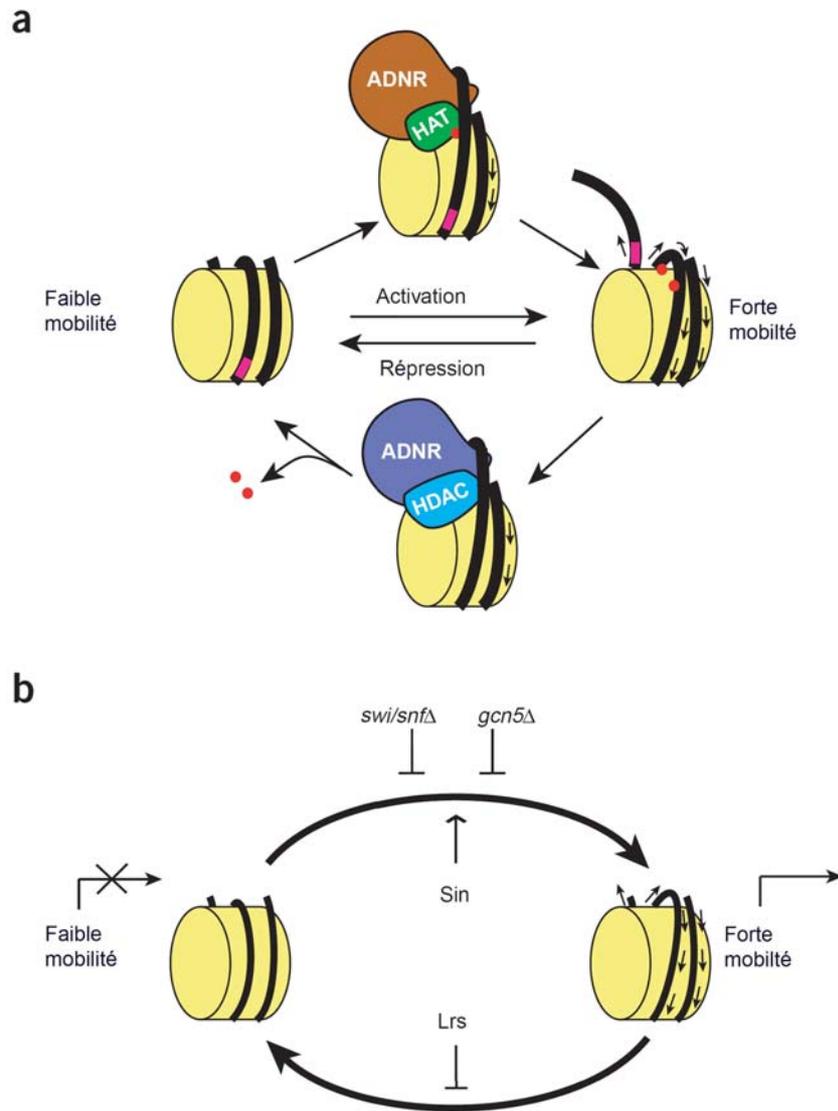


Figure 13 : les complexes HAT et SWI/SNF contribuent à déstabiliser les interactions ADN/nucléosomes. Modèle de la mobilité des nucléosomes, d'après (Cosgrove et al., 2004)

- (a) La chromatine est régulée par des facteurs qui contrôlent l'équilibre entre les nucléosomes faiblement et hautement mobiles. L'intermédiaire représenté est catalysé par l'action concertée des protéines qui remodelent la chromatine (ADNR) et des HATs. L'activation peut être provoquée par les modifications des histones (HATs) qui vont déstabiliser les interactions entre les histones et l'ADN, tandis que la répression peut être l'effet d'enzymes qui vont stabiliser les interactions entre l'ADN et les nucléosomes (HDACs).
- (b) Les régulations de la mobilité des nucléosomes par Swi/Snf et par Gcn5 sont indépendantes. Les KO Gcn5 et Swi/Snf bloquent l'expression des gènes en empêchant que les nucléosomes passent à un état fortement mobile. Les mutations qui conduisent à une diminution de contacts ADN/nucléosomes (Sin) compensent la perte de Gcn5 et Swi/Snf en restaurant une mobilité plus élevée des nucléosomes. La mutation (Lrs) empêche la restauration des contacts ADN/nucléosomes.

3.3.2 – Les protéines qui remodelent la chromatine en présence d'ATP : exemple du complexe SWI/SNF

3.3.2.1 – Introduction

Les complexes multiprotéiques qui remodelent la chromatine utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour modifier la structure de la chromatine. On pense que ces complexes permettent de diminuer les contacts entre l'ADN et les histones, de manière à obtenir un nucléosome dont la mobilité est accrue, et un ADN plus accessible pour interagir avec d'autres facteurs protéiques. Chez la levure, divers complexes multiprotéiques capables de remodeler la structure chromatinienne possèdent une sous-unité qui hydrolyse l'ATP : ySWI/SNF (Cairns et al., 1994 ; Cote et al., 1994), yRSC (Cairns et al., 1996), INO80, ISW11 et ISW12 (Tsukiyama et al., 1999) ou chez l'homme, hSWI/SNF, hNURD (Xue et al., 1998) et hRSF (LeRoy et al., 1998).

Seul le **complexe SWI/SNF** sera décrit lors de cette thèse. Ce complexe joue un rôle critique dans la régulation de la transcription et se lie à l'ADN et aux nucléosomes avec une haute affinité (Fry and Peterson, 2001 ; Peterson and Workman, 2000).

3.3.2.2 – Fonctions des complexes SWI/SNF

Chez la levure, la plupart des sous-unités du complexe SWI/SNF ont été identifiées comme des régulateurs positifs de la transcription. Ce complexe est également requis pour l'expression de gènes hautement inductibles tels que *HIS3*, *SUC2*, *INO1* ou *PHO8* (Winston and Carlson, 1992). Plus globalement, il semble jouer un rôle au niveau de l'activation de la transcription des gènes exprimés pendant la mitose (Sudarsanam et al., 2000).

Les cellules des **mammifères** possèdent **deux complexes SWI/SNF** qui partagent la plupart de leurs sous-unités et qui se distinguent par leur sous-unité à activité ATPase, hBRG ou hBRM. Il a été montré que ces complexes sont capables d'activer la transcription impliquant le récepteur des glucocorticoïdes (Fryer and Archer, 1998), le récepteur aux œstrogènes (DiRenzo et al., 2000), c-myc (Cheng et al., 1999), le facteur « *heat shock* » ou encore MyoD (de la Serna et al., 2001).

Comme chez la levure, ces protéines semblent être impliquées dans la progression du cycle cellulaire. hSWI/SNF est en effet requis pour la régulation de l'expression de la cycline A et de la cycline E et pour la progression du cycle cellulaire au niveau des points de contrôle G1/S et S/G2 (Coisy et al., 2004; Galarneau et al., 2000 ; Strobeck et al., 2000). L'inactivation de la protéine hBRM (KO chez la souris) provoque une augmentation de la prolifération des cellules qui facilite l'apparition de tumeurs (Bultman et al., 2000). Enfin, les complexes SWI/SNF sont connus pour interagir avec les protéines Rb, cycline E et BRCA1, ce qui confirme la théorie de l'implication de ces complexes dans la progression du cycle cellulaire.

3.3.2.3 – Mécanismes proposés pour remodeler la chromatine en présence d'ATP

Le complexe SWI/SNF, qui hydrolyse l'ATP, est capable de remodeler la chromatine. De nombreuses expériences *in vitro* ont été réalisées pour tenter de comprendre quels

peuvent être les mécanismes régissant ce remodelage. Il a ainsi été proposé que les complexes SWI/SNF **interrompent le phasage rotationnel de l'ADN** sur la surface des octamères d'histones, ou encore **altèrent les contacts histones-ADN**.

Les complexes SWI/SNF peuvent déplacer les nucléosomes, soit d'un brin d'ADN à un autre, soit sur le même brin d'ADN, par glissement (Whitehouse et al., 1999). SWI/SNF peut encore rendre l'ADN accessible, soit en conservant les histones en place, soit en les remplaçant par des variants (Mohrmann and Verrijzer, 2005).

On pense que ces différentes modifications peuvent faciliter l'accès de protéines à l'ADN.

3.3.2.4 – Action concertée des complexes remodelant la chromatine et des complexes acétylant la chromatine

La fonction de certains activateurs transcriptionnels ainsi que l'expression de certains gènes requièrent une **action concertée des complexes remodelant la chromatine** SWI/SNF et de protéines impliquées dans **l'acétylation des histones** telles que Gcn5. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine chez la levure ont montré que le complexe γ SWI/SNF se fixe d'abord sur le promoteur du gène *HO*, permettant alors le recrutement des complexes qui contiennent l'HAT Gcn5 durant la fin de la mitose (Cosma et al., 1999 ; Krebs et al., 1999). Cet ordre de recrutement semble pouvoir se généraliser, puisqu'à plus grande échelle, Krebs et al. ont montré que l'activité de remodelage de la chromatine de γ SWI/SNF est nécessaire au recrutement de Gcn5 pour une large panoplie de gènes exprimés à la fin de la mitose (Krebs et al., 2000). A l'inverse, d'autres études ont montré chez les mammifères que, durant l'induction transcriptionnelle par IFN β , l'activité HAT est requise pour recruter le complexe SWI/SNF (Agalioti et al., 2000 ; Fry and Peterson, 2001). Divers cas de figure illustrent l'interdépendance entre le recrutement de HAT et celui du complexe SWI/SNF.

Les mécanismes d'action des complexes remodelant la chromatine se sont pas encore compris avec précision. Quoiqu'il en soit, ces protéines participent à créer un environnement chromatinien favorable à l'accessibilité de divers facteurs, et sont généralement requises pour la transcription de nombreux gènes.

3.4 – Les protéines capables d'induire des modifications post-traductionnelles au niveau des histones

La structure de la chromatine peut être modifiée par plusieurs catégories de protéines. Outre les complexes remodelant la chromatine en présence d'ATP comme le complexe SWI/SNF décrit au paragraphe précédent, on trouve des protéines qui vont induire des modifications covalentes au niveau de l'extrémité N-terminale des histones.

De nombreuses modifications post-traductionnelles au niveau de l'extrémité N-terminale des histones ont dorénavant été mises en évidence, comme l'acétylation, la phosphorylation, la

méthylation. Certaines modifications post-traductionnelles comme l'acétylation des histones sont associées à des régions de la chromatine actives en transcription.

Une théorie très en vogue ces dix dernières années propose que les modifications posttraductionnelles en N-terminal des histones modifient la structure de la chromatine, soit directement en influençant les contacts entre histone/ADN et entre histones elles-mêmes, soit indirectement en recrutant des protéines capables de reconnaître les marques chimiques sur les queues des histones.

3.4.1 – Le code des histones et le code activateur

3.4.1.1 – Le code des histones

Après la mise en évidence d'activités d'acétylation ou de méthylation pour certains cofacteurs transcriptionnels, il a été proposé que différentes combinaisons de modifications posttraductionnelles au niveau des extrémités N-terminales des histones facilitent ou inhibent la liaison de protéines effectrices à la chromatine. Ainsi, une **combinaison de modifications posttraductionnelles** des histones au niveau d'un promoteur spécifique peut aboutir soit à la liaison, soit à la dissociation de facteurs qui favorisent le « *permissive chromatin state* » (coactivateurs) ou le « *non permissive chromatin state* » (corépresseurs).

Le modèle du **code des histones** propose l'intervention de deux vagues successives de protéines qui permettent l'activation de la transcription. La **première vague** de protéines modifierait d'une **manière covalente** les histones au niveau du promoteur. Ces modifications constitueraient un environnement structural propice au recrutement d'une **deuxième vague** de protéines. Ces protéines pourraient alors induire un changement local au niveau de la structure de la chromatine. Dans le cas de l'intervention de coactivateurs, la chromatine se retrouverait localement dans une conformation moins compacte, « *permissive chromatin state* », permettant le recrutement des facteurs généraux de la transcription, ainsi que leur fixation au niveau du promoteur, suivie de l'assemblage du PIC.

3.4.1.2 – Différentes modifications post-traductionnelles au niveau des histones

De nombreuses modifications post-traductionnelles sur l'extrémité N-terminale des histones ont maintenant été décrites. Citons : l'**acétylation** et la **méthylation** des lysines et des arginines, la **phosphorylation** des sérines et des thréonines, l'**ubiquitination**, la **sumoylation**, la **ribosylation** des lysines, la **citrullination** des arginines (Cuthbert et al., 2004), ou encore l'isomérisation des prolines (T.Kouzarides, communication personnelle). Les conséquences de ces modifications post-traductionnelles peuvent être très diverses (voir chapitre 3.4.4) et dépendre de la région de la chromatine modifiée. Ainsi l'acétylation de l'histone H3 ou bien H4 est associée à des régions de la chromatine actives en transcription, tandis que la méthylation de H3 est souvent corrélée à des régions de la chromatine inactives en transcription.

3.4.1.3 – Influence des modifications les unes sur les autres

Les modifications ne surviennent pas d'une façon indépendante, mais s'influencent entre elles. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 sur H3 favorise l'acétylation de H3-K14 par Gcn5 (Cheung et al., 2000 ; Lo et al., 2000) et inhibe la méthylation de H3-K9 (Akhtar and Becker, 2000). Ainsi cette combinaison, l'acétylation des histones H4-K8, H3-K14 et la phosphorylation de H3-S10, est associée à une activation de la transcription.

Inversement, la méthylation de H3-K9 inhibe la phosphorylation de H3-S10 et coïncide avec la répression de la transcription. La séquence de modifications post-traductionnelles appliquée au niveau des histones est importante, et permettra d'aboutir à une combinaison de modifications fonctionnelles.

3.4.1.4 – Le code des cofacteurs

Les cofacteurs qui écrivent et lisent le code des histones sont eux-même régulés par des modifications post-traductionnelles. Ces modifications peuvent elles-mêmes constituer un code permettant d'activer ou d'inhiber les différentes activités enzymatiques des protéines qui induisent des modifications post-traductionnelles en N-terminal des histones. Ceci pourrait participer à la régulation fine de l'expression de gènes particuliers, notamment après induction de signaux extérieurs à la cellule.

Un exemple tout à fait convaincant de ce code des cofacteurs est p300/CBP. L'activité enzymatique de cette protéine peut être régulée par des modifications telles que la phosphorylation par des kinases comme la protéine kinase A, calcium/calmodulin kinase IV, MAPK et pp90Rsk (Goodman and Smolik, 2000), cyclin/Cdc2 et cyclin/Cdk2 (Banerjee et al., 1994) ou bien par la méthylation grâce à une enzyme nommée CARM1 (Chevallard-Briet et al., 2002). Ces modifications posttraductionnelles sont capables de moduler l'activité HAT de p300/CBP, ce qui peut avoir un impact direct sur le niveau de transcription d'un gène.

3.4.1.5 – Plateforme formée par différentes modifications post-traductionnelles au niveau des histones

Ainsi, les modifications de la chromatine forment une plateforme dynamique, sur laquelle des modifications post-traductionnelles séquentielles coordonnent le recrutement des enzymes, qui régulent à la fois la structure de la chromatine et la transduction du signal.

3.4.2 – Les protéines douées d'activité HAT (Histone Acétyl Transférase)

L'acétylation des histones se caractérise par le transfert d'un groupement acétyl provenant d'un donneur tel que l'acétylcoenzyme A sur les lysines des histones. Cette modification post-traductionnelle est très étudiée et ceci est en partie dû au fait que de nombreuses HAT (*Histone Acetyl Transferase*) et HDAC (*Histone Deacetylase*) ont été découvertes ces dix dernières années. Lorsque de telles activités ont été mises en évidence pour des cofacteurs transcriptionnels, tels que p300, CBP, hGCN5 ou PCAF, il a été suggéré que l'acétylation des histones puisse participer à l'activation de la transcription en décompactant la structure de la chromatine. Cette théorie est confortée par la présence

d'histones hyperacétylées dans les régions actives de la chromatine. Aussi, l'implication des protéines douées d'activité HAT dans l'activation de la transcription n'est plus à mettre en doute (Kuo and Allis, 1998 ; Struhl, 1998).

Pourtant, le mécanisme précis reliant l'acétylation des histones et l'activation de la transcription n'est toujours pas élucidé.

3.4.2.1 – Différents mécanismes tentent d'expliquer l'implication de protéines douées d'activité HAT dans l'activation de la transcription

Premièrement, l'acétylation des histones peut participer à définir des domaines nucléaires complexes : ceci pourrait alors, d'une façon globale, influencer la transcription des gènes situés dans des régions hautement structurées de la chromatine (Horn et al., 2002).

A un niveau plus local, on pense que l'acétylation constitue une sorte de signal pour recruter les facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription.

Deuxièmement, il a été proposé que l'acétylation des histones chromatinien au niveau des promoteurs conduit à une structure de la chromatine moins compacte, permettant l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription.

Diverses équipes proposent des mécanismes qui tentent d'expliquer comment les modifications en N-terminal des histones peuvent modifier la structure de la chromatine, directement ou indirectement.

Certains modèles proposent une implication directe de l'acétylation des histones dans les changements de la structure de la chromatine :

- l'acétylation des histones permettrait de restructurer la région promotrice, nécessaire au recrutement et à la stabilisation de toute la machinerie de transcription (Anderson et al., 2001; Sewack et al., 2001) ;
- l'acétylation des histones pourrait induire des changements de charges (neutralisation) entraînant une diminution du contact ADN/histones, ou une altération des interactions histone/histone entre nucléosomes voisins.

Des études physiques ont montré qu'*in vivo*, l'hyperacétylation des histones était sans conséquences sur les propriétés hydrodynamiques et sur l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome (Peterson and Laniel, 2004). L'acétylation des histones n'est peut-être pas **directement** responsable d'une modification de la structure chromatinienne.

Par contre, de nombreuses études ont maintenant démontré que les modifications spécifiques des histones exercent un certain contrôle sur la liaison de diverses protéines sur la fibre de la chromatine. C'est l'hypothèse du code des histones, qui est maintenant bien admise.

Que le rôle des HATs soit direct ou indirect, leur importance pour établir un contexte chromatinien optimal pour initier la transcription n'est plus à mettre en doute. Ainsi ces dix dernières années, on a pu déceler des activités HATs pour de nombreux coactivateurs, comme GCN5, PCAF (Yang et al., 1996), p300/CBP (Bannister and Kouzarides, 1996 ; Ogryzko et al., 1996), ACTR/Src1 (Chen et al., 1997 ; Spencer et al., 1997), TIP60 (Yamamoto and Horikoshi, 1997) et TAF 1 (Mizzen et al., 1996). Ces différentes enzymes possèdent de

nombreuses homologies de séquences, ce qui a permis de regrouper ces protéines en trois superfamilles : GNAT, MYST et p300/CBP.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des protéines douées d'activité HAT.

| <i>HAT</i> | <i>Organismes possédant la HAT</i> | <i>Fonctions/effets connus</i> | <i>Spécificité de l'enzyme recombinante in vitro</i> | <i>Complexes HAT connus (spécificités pour les histones nucléosomales in vitro)</i> |
|---|------------------------------------|---|--|---|
| superfamille GNAT | | | | |
| Hat1 | Variés (levure -> humain) | Aucune (histone deposition-related B-type HAT) | H4 | Levure HAT-B, HAT-A3 (pas d'acétylation de nucléosomes) |
| Gon5 | Variés (levure -> humain) | Coactivateur (adaptateur) | H3/H4 | Levure : ADA, SAGA (H3/H2B) |
| PCAF | Humain, souris | Coactivateur (adaptateur) | H3/H4 | Humain : complexe GCN5, STAGA, TFC (H3, H2B) |
| Eip3 | Levure | élongation de la transcription | - | Humain : complexe PCAF (H3/H4) |
| Hpa2 | Levure | inconnue | H3/H4 | Elongateur, polymérase II holoenzyme (H3/H4) |
| famille MYST | | | | |
| Sas2 | Levure | co-répresseur | - | - |
| Sas3 | Levure | co-répresseur | H3/H4/H2A | NuA3c (H3) |
| Esa1 | Levure | progression du cycle cellulaire | H4/H3/H2A | NuA4 (H4/H2A) |
| MOF | Drosophile | compensation de dose | H4/H3/H2A | complexe MSL (H4) |
| Tip60 | Humain | co-activateur, réparation | H4/H3/H2A | complexe Tip60 |
| MOZ | Humain | Leukémogénèse | - | - |
| MORF | Humain | très homologue à MOZ | H4/H3/H2A | - |
| HBO1 | Humain | interaction avec ORC | - | complexe HBO1 |
| p300/CBP | Variés (multicellulaires) | co-activateur, réparation | H2A/H2B/H3/H4 | - |
| Coactivateurs des récepteurs nucléaires | | | | |
| <i>coactivateurs des récepteurs nucléaires (réponse transcriptionnelle à des signaux hormonaux)</i> | | | | |
| SRC-1 | Humain, souris | - | H3/H4 | - |
| ACTR | Humain, souris | - | H3/H4 | - |
| TIF2 | Humain, souris | - | - | - |
| TAFII250 | Variés (levure -> humain) | facteur associé à TBP | H3/H4 | TFIID |
| TFIIIC | - | initiation de la transcription par l'ARN polymérase III | - | TFIIIC (H2A/H3/H4) |
| TFIIIC220 | Humain | - | - | - |
| TFIIIC110 | Humain | - | - | - |
| TFIIIC90 | Humain | - | H3 | - |

3.4.2.2 – La superfamille GNATs (Gcn5-related acetyltransferases)

Ces protéines ont été regroupées sur la base de quelques régions homologues, notamment du motif lié à l'acétylation. Ce groupe comprend les protéines de levure Gcn5, Hat1, Elp3 et Hpa2, et une variété d'autres HATs eucaryotes (GCN5, PCAF) et procaryotes à substrats différents. Ces protéines sont donc très conservées au cours de l'évolution. Ces HATs acétylent principalement l'histone H3. Les protéines de cette famille sont importantes pour la régulation de la croissance cellulaire et du développement.

Il a été montré que ces protéines GNAT font partie de complexes possédant des rôles de coactivateurs transcriptionnels et de réparation de l'ADN. Je décrirai tout d'abord les fonctions présumées pour quelques protéines de cette famille.

3.4.2.2.1 – Structure de la superfamille GNAT

Cette superfamille est définie par la conservation de 4 motifs, C, D, A et B (de N-terminal vers C-terminal) dont la fonction n'est pas complètement comprise. Le motif C est retrouvé dans la majorité des membres de la famille GNAT, mais pas dans la plupart des HATs connues. Le motif A constitue la région la plus conservée et elle est retrouvée dans d'autres familles de HATs, comme la famille MYST. Ce motif contient un segment Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala qui est spécifiquement impliqué dans la reconnaissance et la liaison d'un substrat : l'acétyl-CoA (Dutnall et al., 1998).

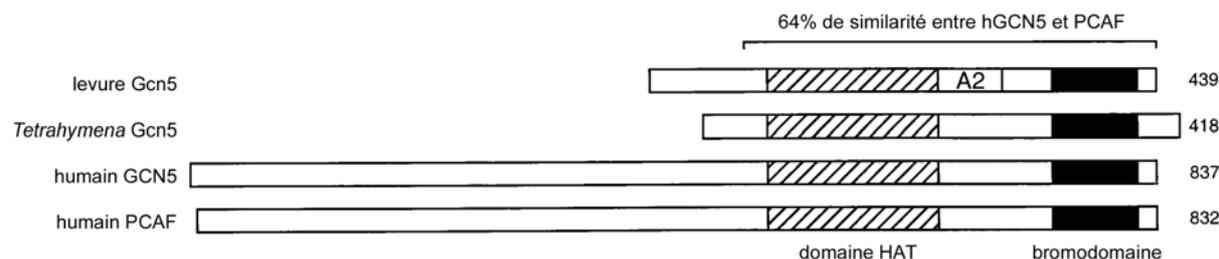


Figure 14 : Alignement des protéines de la superfamille GNAT, le sous-groupe Gcn5, d'après (Sterner and Berger, 2000)

Cet alignement montre la localisation des domaines HAT et bromodomaine. L'indication A2 correspond au domaine de Gcn5 chez la levure connu pour interagir avec la protéine Ada2. La région N-terminale de PCAF interagit avec p300/CBP et aussi avec SRC-1 (coactivateur des récepteurs nucléaires).

3.4.2.2.2 – GCN5 /PCAF

3.4.2.2.2.1 – yGcn5

L'activité HAT de cette protéine a été découverte chez *Tetrahymena thermophila* grâce à un « *in gel assay* » (Brownell et al., 1996). Chez la levure, cette protéine correspond à la protéine Gcn5 déjà connue pour ses capacités de coactivateur transcriptionnel. De nombreux homologues de la protéine Gcn5 ont ensuite été clonés et séquencés avec succès dans divers organismes divergents (humain, souris, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* et *Toxoplasma gondii*), ce qui suggère que sa fonction est hautement conservée chez les eucaryotes.

Cette protéine est actuellement l'HAT la mieux caractérisée au niveau structural et au niveau fonctionnel *in vivo* et *in vitro*. Les domaines fonctionnels de cette protéine incluent un bromodomaine en C-terminal, un domaine d'interaction avec la protéine Ada2 et un domaine HAT (Candau and Berger, 1996 ; Candau et al., 1997)(Figure 14). Le domaine HAT de Gcn5 de levure a été analysé fonctionnellement par délétions ou mutations. Les mutants dont le domaine HAT est tronqué ne sont plus capables d'activer la transcription *via* la protéine ADA2 (Candau et al., 1997). Des études de mutagenèse ont permis l'identification d'acides aminés essentiels pour l'activité HAT, et la mise en évidence de l'importance de l'acétylation des histones au promoteur HIS3 par Gcn5 pour la croissance cellulaire ou encore la transcription *in vivo* (Kuo et al., 1998 ; Wang et al., 1998).

La spécificité de substrat de Gcn5 a aussitôt été recherchée. *In vitro*, Gcn5 recombinant est impliqué dans l'acétylation de l'histone H3 (Lys 14) et plus faiblement pour H4 (Lys 8 et Lys 16) lorsque des histones libres sont utilisées comme substrat (Kuo et al., 1996). Mais lorsque les histones sont agencées en nucléosomes, Gcn5 perd son activité d'acétylation (Grant et al., 1997 ; Kuo et al., 1996 ; Ruiz-Garcia et al., 1997). Toutefois, Gcn5 est à nouveau capable d'acétyler les histones en nucléosomes lorsqu'il est retrouvé au sein du complexe multiprotéique SAGA (chapitre 4.5.1).

Lorsque Gcn5 est délété chez la levure, aucun phénotype sévère n'a pu être observé (Georgakopoulos and Thireos, 1992). Par contre, lorsqu'un ou plusieurs sites d'acétylation de Gcn5 sont mutés (sur les histones H3 ou H4), la progression du cycle cellulaire au niveau du passage de la phase G2 à la phase M est perturbée, de même que l'expression de gènes mitotiques (Zhang et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'acétylation sur H3 et H4 est nécessaire pour la survie des cellules, mais que cette activité ne dépend pas uniquement de Gcn5 (Howe et al., 2001). L'action d'acétylation des histones par Gcn5 ne s'applique pas à tous les gènes (Krebs et al., 1999; Kuo et al., 1998 ; Vignali et al., 2000).

La protéine Gcn5 est également impliquée dans le remodelage de la chromatine (Stafford and Morse, 2001). Sur un promoteur (*PHO5*) dont le niveau de transcription n'est pas affecté par la délétion de la protéine Gcn5, la vitesse d'activation de la transcription se trouve ralentie, et ceci semble dû à un remodelage plus lent de la chromatine (Barbaric et al., 2001).

Cette protéine est retrouvée au sein d'un large complexe multiprotéique, nommé SAGA, dont les fonctions sont discutées dans le chapitre 4.5.1.

3.4.2.2.2 – GCN5 et PCAF

Chez les mammifères, deux protéines homologues de Gcn5 chez la levure ont été découvertes, GCN5 et PCAF (*p300/CREB-binding Associated Factor*), dont les séquences sont hautement conservées (70 % d'identité et 80% de similarité). Ces protéines humaines semblent capables d'exercer un rôle d'adapateur et d'acétyler les histones, comme la protéine de levure Gcn5. Si le domaine HAT est bien sûr indispensable à la fonction d'acétylation de GCN5, deux autres domaines semblent capables d'influencer l'activité HAT ainsi que le choix du substrat. Le bromodomaine N-terminal de cette protéine est important dans la reconnaissance du substrat (Xu et al., 1998b). Lorsque ce bromodomaine se lie à une autre protéine comme la protéine kinase DNA/PK, l'activité HAT de GCN5 se trouve alors inhibée (Barlev et al., 1998).

Chez les Vertébrés, deux formes distinctes de GCN5 sont produites par épissage alternatif : une forme courte, qui n'a jamais été bien caractérisée, et une forme longue (hGCN5-L). La forme longue hGCN5-L et la protéine PCAF se ressemblent beaucoup : leurs tailles sont identiques, leurs séquences homologues, elles interagissent toutes les deux avec p300/CBP. Ces deux protéines recombinantes sont capables d'acétyler *in vitro* des histones H3 (Lys14) et d'une manière moins importante H4 (Lys8), qu'elles soient sous forme libre ou bien agencées en nucléosomes (Schiltz et al., 1999 ; Yang et al., 1996). Ces ressemblances suggèrent des fonctions communes aux protéines GCN5 et PCAF.

3.4.2.2.2.1 - Fonctions communes à GCN5 et PCAF

Les protéines PCAF et hGCN5 partagent certaines fonctions, comme l'acétylation sur des sites spécifiques des histones, et ont été décrites comme faisant partie de complexes multiprotéiques qui se ressemblent, les complexes PCAF ou de type TFIIIC. On a alors pensé que les fonctions de ces protéines pourraient être redondantes dans les cellules. Ce n'est en fait pas le cas, puisque l'expression tissulaire de ces protéines est différente, et confère à chaque protéine des fonctions bien particulières.

Chez la souris, des études de KO de la protéine Gcn5L ont montré des problèmes précoces dans le développement embryonnaire, conduisant à la létalité (Xu et al., 2000). Par contre, l'absence de la protéine PCAF n'empêche pas le développement normal des animaux. Lorsque la protéine PCAF est délétée, une augmentation de l'expression de la protéine GCN5 a pu être observée dans certains tissus, ce qui comble éventuellement le défaut d'acétylation par PCAF (Yamauchi et al., 2000).

3.4.2.2.2.2 - Fonctions spécifiques à PCAF

Chez la souris, PCAF est spécifiquement exprimé dans le cœur, les yeux, le foie et le muscle squelettique (Xu et al., 1998b).

Le rôle de la protéine PCAF dans la régulation de la transcription a été beaucoup étudié. En tant que HAT et coactivateur, cette protéine semble impliquée dans la myogénèse (Puri et al., 1997) ainsi que dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires (Blanco et al., 1998 ; Kozus et al., 1998) ou par certains facteurs de croissance (Xu et al., 1998a).

PCAF et l'oncoprotéine E1A lient une région commune au niveau de p300 et se retrouvent en compétition pour lier ce facteur. En fait, lorsque E1A et PCAF sont transfectés dans des cellules, leurs effets au niveau du cycle cellulaire sont opposés : E1A accélère le cycle cellulaire tandis que PCAF inhibe sa progression (Yang et al., 1996). En outre, E1A réduit la transcription médiée par PCAF *in vivo* en se fixant directement sur PCAF (Chakravarti et al., 1999 ; Hamamori et al., 1999). Dans d'autres études, E1A n'inhibe pas l'activité HAT de la protéine PCAF, montrant que cette capacité dépend du système cellulaire utilisé (Reid et al., 1998).

Outre sa capacité à acétyler les histones, la protéine PCAF cible divers substrats comme les protéines HMG1 et HMG17 (Herrera et al., 1999), des activateurs tels que p53 (Liu et al., 1999), MyoD (Sartorelli et al., 1999), Tat (Dorr et al., 2002), ainsi que les facteurs généraux de transcription TFIIE et TFIIIF, ce qui module la fonction de ces protéines.

Les deux activités d'acétylation qui ciblent les histones ou même d'autres facteurs participent conjointement à la fonction physiologique de la protéine PCAF.

3.4.2.3 – p300/CBP

CBP et p300 sont des protéines coactivatrices quasi homologues qui lient un certain nombre de séquences spécifiques d'activateurs transcriptionnels. Ces deux protéines ont tout d'abord été isolées indépendamment, p300 pour son interaction avec E1A, et CBP pour son interaction avec une forme phosphorylée du facteur de transcription CREB. Ces protéines se sont avérées interchangeable dans la plupart de leurs fonctions (dans des cellules en culture).

3.4.2.3.1 – p300 et le contrôle du cycle cellulaire

Le fait que la protéine p300 se lie à l'oncoprotéine E1A suggère que p300 soit impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Lorsque p300 se lie à l'oncoprotéine E1A, le contrôle du cycle cellulaire est perdu (Missero et al., 1995), la synthèse d'ADN augmentée, et la différenciation des cellules est bloquée (Florin-Christensen et al., 1992). Par la suite, des études de KO chez la souris ont fourni des preuves physiologiques de l'implication de p300 dans le contrôle du cycle cellulaire, puisque les KO p300^{-/-} meurent à 10.5 jours, et présentent des problèmes de différenciation au niveau du muscle cardiaque (Yao et al., 1998). De plus, les cellules MEFs des KO p300^{-/-} prolifèrent beaucoup moins rapidement que les cellules intégrant p300, confirmant que p300 influence la croissance et la différenciation des cellules.

3.4.2.3.2 – p300 et l'apoptose

D'autre part, des études ont montré que la protéine p300 est impliquée dans le phénomène de l'apoptose (Avantaggiati et al., 1997 ; Gu et al., 1997). Le manque de p300 dans des cellules provoquent une sensibilité accrue aux irradiations ionisantes (Yuan et al., 1999), et lorsque p300 est séquestré dans des cellules (par E1A par exemple), la voie apoptotique dépendante de p53 est inhibée (Avantaggiati et al., 1997 ; Gu et al., 1997). Une interaction entre p300 et la protéine p53 a été mise en évidence et, par la suite, cette interaction s'est avérée fonctionnelle puisque le recrutement de p53 sur certains promoteurs spécifiques est dépendant de p300, ainsi que l'acétylation des histones (An et al., 2004; Barlev et al., 2001 ; Espinosa et al., 2003). p300 joue donc un rôle important dans l'activation de la transcription médiée par p53.

De plus, p300 semble capable d'acétyler la protéine p53 (Gu and Roeder, 1997), ce qui augmente l'affinité de p53 pour l'ADN (Liu et al., 2003a). Le rôle de p300 dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose est sans doute lié à son activité enzymatique d'acétylation. Enfin, des mutations au niveau du gène p300 ont pu être observées pour de nombreuses tumeurs chez les humains (pour revue, (Giles et al., 1998)), ce qui suggère une activité suppresseur de tumeurs pour la protéine p300.

La protéine p300 est impliquée dans des processus aussi divers que la différenciation des cellules et l'apoptose. Il reste à comprendre comment p300 peut opter pour deux processus cellulaires aussi contradictoires que la mort cellulaire programmée ou la prolifération des cellules.

3.4.2.3.3 – p300, un coactivateur transcriptionnel

Dans diverses études, *in vitro* et *in vivo*, la présence de p300 s'est avérée cruciale pour l'activation de la transcription de nombreux gènes. L'activation de la transcription médiée par les récepteurs à l'acide rétinoïque RAR/RXR, les récepteurs thyroïdiens (Lee et al., 2003b), les récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone ou aux glucocorticoïdes (Acevedo and Kraus, 2003) est augmentée par la présence de la protéine p300. p300 favorise donc l'activité de récepteurs nucléaires.

De même, p300 est capable d'interagir avec toute une panoplie de facteurs impliqués dans l'activation de la transcription (Figure 15), comme c-jun, c-myb, c-fos, myoD (Polesskaya et al., 2001), E2F-1 (Dyson, 1998), SRC-1 (Yao et al., 1996), CREB (Yuan and Gambée, 2001), p53 (An et al., 2004; Barlev et al., 2001 ; Espinosa et al., 2003) et leur acétylation par p300 est indispensable à la fonction de transactivation de ces protéines, puisque des mutations dans le domaine HAT de p300 entraînent la perte de transactivation.

La protéine p300 participe donc à l'activation de la transcription de nombreux gènes, en adéquation avec ses fonctions physiologiques. Le rôle de p300 dans le contrôle du cycle cellulaire peut s'expliquer en partie par son implication dans l'expression de gènes induite par E2F-1. Egalement, le rôle de p300 dans la différenciation des cellules en cellules musculaires pourrait s'expliquer par son implication dans l'activation de la transcription médiée par MyoD, qui déclenche le programme de différenciation des cellules en cellules musculaires.

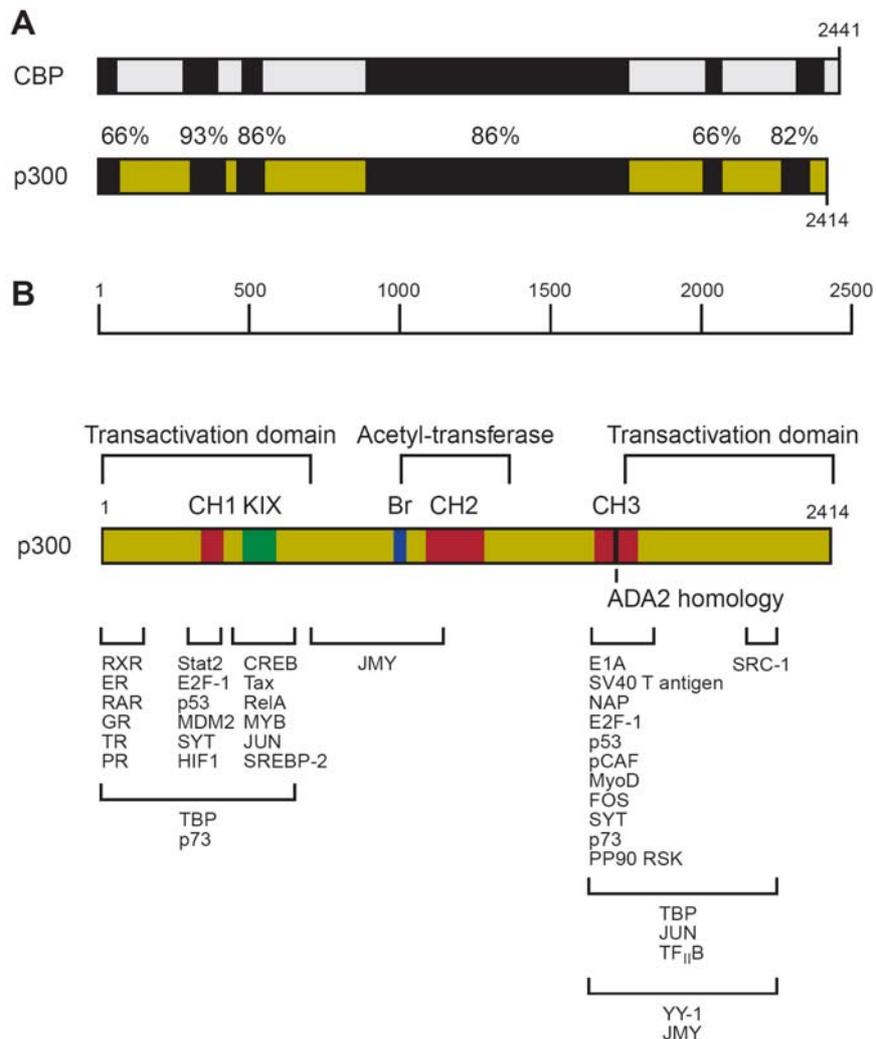


Figure 15 : Organisation des protéines CBP/p300, d'après (Chan and La Thangue, 2001)

A – Comparaison entre CBP et p300. Les régions en noir sont hautement homologues, le pourcentage d'identité en acide aminé est indiqué, ainsi que le nombre d'acide aminé pour chaque protéine.

B - Les domaines fonctionnels de p300 sont indiqués : les domaines riches en cystéine et en histidine, CH1, CH2 et CH3 ; le domaine KIX, le Bromodomaine (Br) et une région homologue à Ada2. Les domaines N-terminal et C-terminal de p300/CBP représentent des domaines de transactivation, tandis que le domaine HAT est situé au centre de la protéine. Les protéines qui interagissent avec ces régions de p300/CBP sont représentées.

3.4.2.3.4 – Mécanismes proposés pour expliquer l'implication de p300 dans l'activation de la transcription

Plusieurs modèles ont été suggérés pour expliquer le rôle de la protéine p300 dans l'activation de la transcription (Figure 16).

Tout d'abord, il a été proposé que p300 serve de pont moléculaire entre la machinerie transcriptionnelle de base et certains coactivateurs. Puis, p300 peut servir de base moléculaire pour la formation de complexes multiprotéiques nécessaires à l'activation de la transcription. Enfin, l'activité enzymatique de la protéine p300 pourrait acétyler d'une part les histones et

faciliter l'accès à l'ADN, et d'autre part certains facteurs de transcription et réguler leur activité, pour conduire à activer la transcription.

Figure 16 : Modèles d'action de p300 dans l'activation de la transcription

3.4.2.3.4.1 – p300 comme pont moléculaire

p300 est capable de lier de nombreux facteurs de la machinerie de transcription de base, comme TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, l'ARN polymérase II, ainsi que de nombreux coactivateurs comme SRC-1, PCAF, hSWI/SNF par exemple. Il a été proposé que p300 fasse le lien entre les facteurs généraux de transcription et de nombreux cofacteurs, ce qui provoquerait une activation de la transcription.

3.4.2.3.4.2 – p300, base pour l'assemblage de complexes multiprotéiques

Il a été proposé que p300 fonctionne comme un point d'ancrage pour la formation de complexes multiprotéiques coactivateurs de la transcription (pour revue, (Xu et al., 1999)). La protéine p300 a souvent été retrouvée en complexe avec d'autres HATs, comme PCAF (Ogryzko et al., 1996), et SRC-1 (Spencer et al., 1997; Yao et al., 1996). En fournissant une base pour l'assemblage des cofacteurs de la transcription, p300 pourrait augmenter au niveau local la concentration de ces cofacteurs et faciliter alors les interactions protéines-protéines et protéines-ADN nécessaires à l'activation de la transcription.

3.4.2.3.4.3 – p300 régule la transcription grâce à son activité d'acétylation des histones

In vitro, le coactivateur p300 peut acétyler les quatre histones dans un contexte nucléosomal (voir Tableau 1)(Bannister and Kouzarides, 1996 ; Ogryzko et al., 1996). L'activité HAT de p300 facilite l'activation de la transcription *in vivo*, mais le mécanisme d'action précis de p300 n'est pas connu.

Comme nous pourrions le voir dans la partie résultats (publication 1), la protéine p300 active fortement la transcription *in vitro* par GAL4-VP16 (Kraus et al., 1999) sur une matrice de chromatine et ceci est dépendant de la présence d'acétyl-CoenzymeA. Ces études suggèrent que l'activité HAT de p300 est essentielle pour activer la transcription par GAL4-VP16 sur une matrice de chromatine.

D'autres études ont montré que la liaison d'activateurs tels que Gal4-VP16 sur une matrice de nucléosomes pouvait faciliter l'accès à l'HAT p300 des queues d'histones (Ito et al., 2000b ; Kundu et al., 2000). Ces résultats suggèrent que le domaine d'activation de VP16 est capable de lier p300 aux nucléosomes *via* le domaine Gal4 qui se lie à l'ADN.

Ces études ont tenté de déterminer le rôle de l'acétylation de p300 dans l'activation de la transcription médiée par GAL4-VP16. On sait dorénavant que le recrutement de p300 est dépendant du recrutement de l'activateur au niveau du promoteur. D'autres modèles ont également montré que la liaison d'un activateur comme p53 peut faciliter l'accès de p300 aux queues d'histones, ce qui stimule la transcription (Espinosa and Emerson, 2001).

Grâce à son activité d'acétylation des histones, p300 est un coactivateur important qui intervient notamment dans l'activation de la transcription par GAL4-VP16 (Chapitre résultats, partie I)

3.4.2.3.4.4 – L'acétylation de certains facteurs de transcription par p300

Outre sa fonction d'acétylation des histones, p300/CBP acétyle également certains activateurs de transcription, comme p53 (Gu and Roeder, 1997), E2F-1, E2F-2 et E2F-3 (Marzio et al., 2000), MYB (Tomita et al., 2000), MyoD (Sartorelli et al., 1999), GATA-1 (Boyes et al., 1998), EKLF (Lorch et al., 1998), HNF-4 (Soutoglou et al., 2000) et NF-Y (Ait-Si-Ali et al., 1998). Dans la plupart des cas, l'acétylation de ces facteurs est capable d'activer leur liaison à l'ADN. Ainsi l'implication de p300 dans l'activation de la transcription peut aussi s'expliquer par l'activation de certains activateurs par acétylation. Les études montrant que le domaine HAT de p300 est indispensable à l'activation de la transcription de certains gènes, ne nous permettent pas de déterminer quelle cible doit être acétylée pour activer la transcription.

3.4.2.3.5 – p300 comme intégrateur de signaux cellulaires

p300 lui même peut subir différentes modifications post-traductionnelles. Ces modifications pourront moduler l'activité de p300 en modifiant son activité d'acétylation. Des études ont montré que l'activité de p300/CBP est régulée par des modifications telles que la phosphorylation par des kinases, comme la protéine kinase A, calcium/calmodulin kinase IV, MAPK et pp90Rsk (Goodman and Smolik, 2000) cyclin/Cdc2 et cyclin/Cdk2 (Banerjee et al., 1994), ou bien par méthylation grâce à une enzyme nommée CARM1 (Chevallard-Briet et al., 2002).

p300 est donc la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles induites par l'activation de diverses voies de signalisation. C'est pourquoi on pense que p300 joue un rôle central dans l'intégration de signaux. Ainsi p300 pourra recevoir des informations cellulaires (différentes modifications post-traductionnelles), les intégrer, modifier son activité HAT, et par là même son activité coactivatrice en transcription.

3.4.2.4 – La famille MYST

Cette famille de protéines est nommée MYST, sigle composé des initiales des quatre protéines MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60, découvertes en premier. Par la suite, la famille MYST s'est agrandie aux protéines Esa1 chez la levure, MOF chez la drosophile, HBO1 et MORF chez les mammifères. Les membres de cette famille présentent une grande homologie dans leur domaine HAT, qui comprend un site de liaison à l'acétyl-CoA (apparenté au motif A de la famille GNAT), ainsi qu'un doigt à Zn atypique et un motif E-R (Esa1-Rpd3), tous deux requis pour l'activité enzymatique et la reconnaissance du substrat (Akhtar and Becker, 2001)(Figure 17). Bien que les protéines de cette famille possèdent des régions très similaires en séquences, elles sont impliquées dans une grande variété de fonctions régulatrices dans divers organismes.

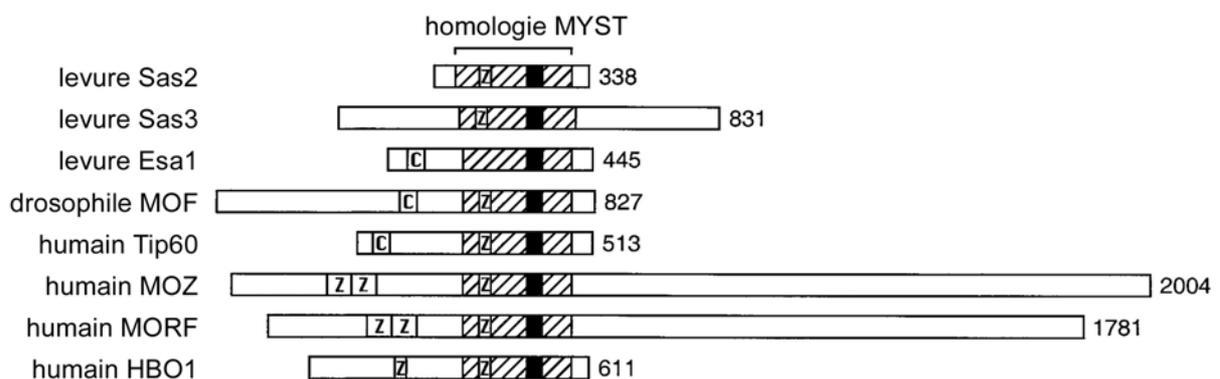


Figure 17 : Alignement des protéines de la famille MYST, d'après (Sterner and Berger, 2000)

La région d'homologie comprend un site de liaison à l'acétyl CoA représenté par une boîte noire, Z, un motif en doigt à zinc, atypique. Les protéines Esa1, Tip60 et MOF sont également dotées d'un domaine ressemblant à un chromodomaine, C.

3.4.2.4.1 – Les HAT TIP60 et Esa1

En 1996, des expériences de double hybride ont permis d'identifier une nouvelle protéine en interaction avec la protéine Tat du virus 1 d'immunodéficience humaine, nommée TIP60 pour *HIV-1-Tat-Interactive Protein* (Kamine et al., 1996). Chez la levure, une protéine très homologue à TIP60 a été identifiée : la protéine Esa1 (« *Essential SAS2-related Acetyltransferase* ») possède des fonctions cellulaires comparables à celles de TIP60.

Des activités acétyltransférases tout à fait particulières ont pu être mises en évidence pour ces deux protéines. Si de nombreuses HAT acétylent principalement l'histone H3 (c'est le cas de hGCN5, PCAF, TAF1), Esa1 et TIP60 semblent préférer l'histone H4 comme substrat (Clarke et al., 1999; Yamamoto and Horikoshi, 1997).

La protéine Esa1 recombinante est capable d'acétyler *in vitro* les histones libres H2A, H3-K14 et H4, avec une préférence pour l'histone H4, plus particulièrement sur la lysine 5 (Clarke et al., 1999). Cependant, cette protéine recombinante est incapable d'acétyler *in vitro* les histones agencées en nucléosomes. *In vivo*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que Esa1 est requise pour acétyler les histones H2A, H2B et H4 sur le promoteur *ino1* (Suka et al., 2001).

Ainsi, *in vivo* la protéine Esa1 est capable d'acétyler l'histone H4 dans un contexte nucléosomal, alors que la protéine recombinante n'acétyle pas *in vitro* les histones agencées en nucléosomes (Allard et al., 1999). Esa1 a peut-être besoin de se trouver dans un contexte cellulaire pour exercer son activité HAT. Cette idée sera discutée dans la partie « complexes multiprotéiques possédant des activités HATs »(chapitre 4.1 et 4.2).

La protéine TIP60, quant à elle, acétyle principalement les histones libres H4 sur les lysines 5, 8, 12, 16, H3 sur la lysine 14 et H2A sur la lysine 5 *in vitro* (Kimura and Horikoshi, 1998). Cependant l'activité de cette protéine est réduite lorsque les histones sont agencées en nucléosomes *in vitro*.

Un complexe multiprotéique associé à TIP60 a récemment été caractérisé et il est capable d'acétyler *in vitro* les histones H4 et H2A agencées en nucléosomes. Cependant, la spécificité de substrat de TIP60 *in vivo* n'a pas encore été caractérisée.

Chez la drosophile, il a été démontré que le complexe TIP60 acétyle préférentiellement l'équivalent de l'histone variant H2AX phosphorylé après induction de cassures double-brin (Kusch et al., 2004). Il se peut ainsi que la spécificité d'action de TIP60 soit régulée en fonction de l'état de la cellule, ce qui expliquerait la multiplicité des rôles de cette protéine.

3.4.2.4.1.1 – TIP60 impliquée dans l'activation de la transcription par p53

La protéine TIP60 et le suppresseur de tumeur p53 partagent certaines fonctions. Ces deux protéines sont impliquées dans la réponse cellulaire déclenchée par des dommages d'ADN. Elles sont dégradées par le protéasome après ubiquitination médiée par Mdm2, et s'accumulent après une irradiation UV.

Chez les mammifères, p53 participe au bon déroulement de la réponse des cellules après induction de dommages à l'ADN. p53 est un facteur de transcription qui, après induction de dommages à l'ADN, régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules et dans l'apoptose ou la réparation de l'ADN. En

l'absence de la protéine p53, la réponse cellulaire aux cassures d'ADN est anormale et conduit à l'accumulation de mutations dans le génome (Michael and Oren, 2002).

En absence d'ADN endommagé, l'activité de p53 est contrôlée par le proto-oncogène Mdm2. Mdm2 se lie directement à p53 et réprime son activité en accélérant sa dégradation *via* le protéasome, et en inhibant l'activation de la transcription par p53. Lorsque l'ADN est endommagé, p53 est phosphorylée par la voie de signalisation ATM/ATR chk1/chk2, ce qui entraîne sa dissociation de Mdm2. p53 est alors libre d'activer la transcription de certains gènes.

TIP60 est impliqué dans la voie de signalisation p53 à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle contribue à maintenir un niveau basal de p53 dans les cellules en contrecarrant la dégradation de p53. Puis, après induction de cassures d'ADN, TIP60 fonctionne comme coactivateur de p53 (Legube et al., 2004). Chez la levure, le complexe NuA4, qui contient l'HAT Esa1, est également requis pour l'activation de la transcription par p53 (Eisen et al., 2001).

La protéine p400, membre du complexe TIP60, semble, au contraire, inhiber l'activation de la transcription de p21 par p53 (Chan et al., 2005). Deux protéines du même complexe peuvent agir d'une manière opposée dans la voie de signalisation impliquant p53. Ces deux protéines ne sont probablement pas retrouvées dans le même complexe lorsqu'elles exercent leur fonctions inverses, mais cette supposition reste à tester.

Notons que la protéine hTRRAP étudiée dans cette thèse interagit avec p53, et fait parti du complexe TIP60. Il est donc fort probable que hTRRAP joue un rôle dans la réponse cellulaire impliquant p53 (voir Discussion, chapitre 2.2.3).

3.4.2.4.1.2 – TIP60, coactivateur de la transcription

L'acétylation de la queue des histones est souvent corrélée à une activation de la transcription. Ainsi il n'est guère surprenant de constater que l'HAT TIP60 agit comme coactivateur transcriptionnel. Par exemple, lorsque TIP60 est surexprimée dans des cellules, l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires de classe I est accrue (Brady et al., 1999 ; Gaughan et al., 2001). Il faut également signaler que la présence de TIP60 endogène sur les gènes cibles de c-myc et de NFκB renforce leurs rôles de coactivateurs transcriptionnels (Baek et al., 2002b; Frank et al., 2003). Enfin, la surexpression d'un dominant négatif de TIP60 dont l'activité HAT a été délétée, conduit à une acétylation retardée des histones H4 sur les promoteurs cibles de c-myc. Plus récemment, on a découvert que TIP60 est impliquée dans la maladie d'Alzheimer par stimulation de la transcription lorsqu'elle est associée avec le fragment cytoplasmique de la protéine précurseur de l'amyloïd-β (APP) et la protéine nucléaire adaptatrice (Fe65)(Cao and Sudhof, 2001).

L'ensemble de ces résultats montre que TIP60 participe à l'activation de la transcription. Pourtant, TIP60 est également douée d'activité co-répressive de la transcription, notamment lors de l'activation de la transcription par STAT3, quand TIP60 se lie à une enzyme déacétylant les histones, HDAC7 (Xiao et al., 2003).

TIP60 joue aussi un rôle dans la transcription des gènes ribosomiques (Halkidou et al., 2004), ce qui implique TIP60 dans la régulation de la transcription d'un large éventail de gènes.

Outre son activité HAT, TIP60 est capable d'acétyler d'autres substrats que les histones, par exemple le récepteur aux androgènes AR. L'acétylation de AR va conduire à l'activation de la transcription de gènes cibles (Gaughan et al., 2002). Ainsi TIP60 active la transcription en acétylant soit directement les histones, soit divers activateurs ou coactivateurs.

La multiplicité de fonctions qu'exerce TIP60 suggère que l'environnement (protéines associées) de cette protéine puisse modifier son activité.

3.4.2.4.1.3 – TIP60 et la réparation des cassures d'ADN

Les protéines de la famille MYST sont impliquées dans la réparation de l'ADN. L'expression d'un mutant de TIP60, dont le domaine HAT est tronqué, résulte en une déficience au niveau de la réparation des cassures doubles-brins de l'ADN (DSB) (Ikura et al., 2000). De même, l'acétylation de l'histone H4 par Esa1 est requise pour la réparation des DSB (Bird et al., 2002)(voir chapitre 6.2.1.2).

L'homologue humain TIP60 a été isolé comme membre d'un complexe multimérique nommé complexe TIP60 par l'équipe du Dr Nakatani. En plus de posséder une activité HAT, ce complexe possède une activité ATPase, DNA hélicase, et se lie à l'ADN. La surexpression de TIP60 sans domaine HAT conduit à un défaut de réparation des cassures double-brin de l'ADN, ainsi qu'à une incapacité des cellules à entrer en apoptose. Ensemble, ces données suggèrent que TIP60 relie la machinerie de signalisation de dommages dans l'ADN à celle de l'apoptose (Ikura et al., 2000).

3.4.2.4.1.4 – Brève conclusion sur les protéines TIP60

La protéine TIP60 est donc impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la transcription, la réparation de l'ADN ou encore le contrôle du cycle cellulaire. La diversité fonctionnelle de TIP60 peut s'expliquer par la multiplicité de ses interactants, ou encore par la modulation de son activité enzymatique. Cette activité peut en effet être modifiée en fonction du degré de phosphorylation de TIP60, et la mutation au niveau des sites de phosphorylation inhibe l'activité HAT de TIP60 (Lemerancier et al., 2003). La diversité des effets possibles de TIP60 est ainsi augmentée selon les modifications post-traductionnelles qui lui sont appliquées.

3.4.2.4.2 – L'HAT MOF, membre de la famille MYST

Cette protéine fait partie du complexe MSL (*Male-Specific-Lethal*) de compensation de dose chez la drosophile qui comprend les protéines Msl1, Msl2, Msl3, une hélicase Mle, l'HAT dMof et deux ARN non codants. Ce complexe acétyle spécifiquement la lysine 16 de l'histone H4 *in vitro* et *in vivo*, et est responsable de l'hyperacétylation du chromosome X mâle chez la Drosophile (Akhtar and Becker, 2000). Cette hyperacétylation est associée à une hypertranscription au niveau de *loci* sur l'unique chromosome X male. Elle va permettre d'aboutir à un niveau d'expression des gènes équivalent chez les drosophiles mâles et femelles, alors que les mâles ne sont dotés que d'un chromosome X : c'est le phénomène de compensation de dose (pour revue, (Chiang and Kurnit, 2003)).

3.4.2.4.3 – Les protéines Sas2 et Sas3, membres de la famille MYST

D'autres protéines HATs de la famille MYST possèdent un rôle dans le « *gene silencing* » : la fonction HAT de Sas2 (*Something About Silencing 2*) est requise pour le *silencing* au niveau du locus *HML* de la levure et aux télomères (Donze and Kamakaka, 2001 ; Osada et al., 2001). Sas2 est responsable de l'acétylation de l'histone H4 sur la Lys16 et a une fonction antagoniste par rapport à l'histone déacétylase Sir2 (Reifsnnyder et al., 1996). Le rôle de Sas2 dans le silencing est de maintenir la structure hétérochromatinienne au niveau des télomères.

3.4.2.5 – Les protéines de la famille MYST, brève conclusion

La famille d'histone acétyltransférases MYST regroupe des protéines dont les fonctions sont très diverses, selon les rôles variables de l'acétylation des histones dans divers processus biologiques. Toutes ces protéines partagent le domaine catalytique MYST. Chaque organisme eucaryote, même unicellulaire possède plusieurs protéines de cette famille, ce qui souligne l'utilisation répandue et très précoce de ce mécanisme catalytique chez les eucaryotes. La plupart de ces protéines sont retrouvées au sein de complexes multiprotéiques, comme Esa1 dans le complexe NuA4, ou TIP60 dans le complexe TIP60 humain, et il est vraisemblable que cette association en complexes confère une spécificité fonctionnelle particulière à ces HATs (voir chapitre 4.2).

3.4.2.6 – Equilibre entre les activités HAT et HDAC

Bien que des progrès fantastiques aient été réalisés dans la compréhension de la structure et de la fonction des HATs et des HDAC individuellement, il reste à expliquer comment l'activité opposée de ces deux classes d'enzymes est régulée.

Les HATs et les HDACs peuvent se trouver assez proches dans des cellules *in vivo*. Des HATs comme PCAF ou GCN5 ont même été retrouvées en complexe avec HDAC1. D'après la même étude, le complexe formé par les HATs et les HDACs serait détruit lors de la différenciation cellulaire, libérant les HATs qui peuvent alors activer la transcription de certains gènes (Yamagoe et al., 2003).

La position globale et le recrutement des HATs et des HDACs dans le génome de levure ont été étudiés : Gcn5 et Esa1 sont globalement recrutés au niveau des promoteurs de gènes activement transcrits, tandis que les déacétylases Hst1 et Rpd3 sont recrutées plus spécifiquement au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans des fonctions particulières (Robert et al., 2004).

Puisque les HATs et les HDACs peuvent être recrutées ensemble au niveau d'un promoteur, il faudrait qu'un signal particulier active une des deux classes d'enzymes à un moment précis, soit pour activer, soit pour inhiber la transcription des gènes. L'équilibre entre activité HAT et activité HDAC doit être très sensible et donc contribuer à réguler finement l'expression de gènes particuliers.

3.4.3 – Autres modifications covalentes au niveau de l'extrémité N-terminale des histones

3.4.3.1 – Phosphorylation des histones et activation de la transcription

Dès les années 1990, on a suspecté une implication de la phosphorylation des histones dans l'induction de la transcription des gènes dits précoces, comme le gène *c-Fos* chez l'humain (Mahadevan et al., 1991). Ces études ont été suivies par la mise en évidence d'une famille de protéines, **Rsk/Msk**, qui régule directement la phosphorylation des histones (Clayton and Mahadevan, 2003). Cette modification post-traductionnelle est associée à la condensation des chromosomes et à leur ségrégation lors de la mitose et de la méiose (Gurley et al., 1978). Elle prend son origine au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique et se disperse au niveau de l'ensemble du génome lors de la transition de phase G2/M (Hendzel et al., 1997). En outre, la phosphorylation de **S10-H3** est nécessaire à l'initiation de la condensation des chromosomes chez les mammifères.

Il est aussi à signaler que l'induction de gène *heat-shock* chez la drosophile s'accompagne d'une forte augmentation de la phosphorylation de la Ser3 de l'histone H3 (Nowak and Corces, 2004). Ainsi la phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3 est associée à une transcription active. A l'inverse, la **phosphatase PP2A** (*Protein Phosphatase 2A*) qui retire le phosphate de la Ser10 de l'histone H3 affecte la transcription en l'inhibant (Nowak and Corces, 2004). L'implication de ces protéines kinases dans la transcription suggère qu'elles soient spécifiquement recrutées au niveau de promoteurs, en tant que coactivateurs de la transcription. On ne connaît pas encore de protéine capable de reconnaître spécifiquement l'histone H3 phosphorylée. Toutefois une étude chez la levure montre que la phosphorylation de l'histone H3 facilite le recrutement de la protéine TBP au niveau du promoteur (Lo et al., 2005).

3.4.3.2 – Méthylation des histones

Les enzymes qui méthylent les histones peuvent être classées en deux catégories, selon leur spécificité de substrat : les lysines ou les arginines de l'extrémité N-terminale des histones.

3.4.3.2.1 – Méthylation des histones et activation de la transcription

Il existe deux types d'HMT (*Histone Methyl Transférase*) capables de modifier les histones sur des résidus arginine : **CARM1** (*Co-Activator-associated arginine Methyltransferase 1*) et **PRMT1** (*Protein Arginine Methyltransferase 1*). CARM1 est un coactivateur des récepteurs nucléaires qui peut méthyler *in vitro* les histones H3 et H2B sur plusieurs résidus arginine, ce qui constitue un événement important pour l'activation de la transcription de gènes cibles (Chen et al., 1999a).

Les PRMTs, pour leur part, sont des HATs spécifiques du résidu arginine en position 3 de l'histone H4. La méthylation de l'Arg3 facilite l'acétylation de l'histone H4 par p300/CBP, ce qui va conduire à l'activation de la transcription (Wang et al., 2001a).

3.4.3.2.2 – Méthylation des histones et inhibition de la transcription

Des méthylations peuvent également survenir sur les résidus lysines des histones et un résidu peut accepter un, deux, ou trois groupes méthyl. Plusieurs études décrivent la méthylation de la Lys9 de l'histone H3 comme une marque de la répression de la transcription. L'enzyme **Suv39H1**, spécifique de cette méthylation, est impliquée dans le *silencing* péricentromérique, mais également dans le *silencing* des gènes localisés au niveau de l'euchromatine (Vandel et al., 2001). Or, certaines enzymes, contenant un chromodomaine, sont capables de reconnaître spécifiquement la Lys9 de l'histone H3 méthylée. C'est le cas de la protéine HP1 qui recrute une déacétylase probablement capable de déacétyler les nucléosomes voisins. Ceci pourrait expliquer comment la méthylation de la Lys9 de l'histone H3 conduit à l'inhibition de la transcription.

Les régions inactives en transcription sont souvent associées à des méthylations de l'ADN qui s'effectuent particulièrement sur les cytosines des dinucléotides CpG. Chez les vertébrés, environ 60 à 90 % des dinucléotides sont méthylés, et beaucoup de dinucléotides non méthylés sont situés dans des régions appelées **îlots CpG** qui regroupent un grand nombre de promoteurs fonctionnels (Razin and Riggs, 1980).

3.4.3.3 – Ubiquitination des histones et activation de la transcription

L'ubiquitination des histones peut également jouer un rôle dans la transcription.

TAF1 (la HAT de TFIID) est impliquée dans l'ubiquitination de l'histone H1. Or, certaines mutations de TAF1 pour l'activité d'ubiquitination chez la drosophile entraînent une perturbation de l'activation de la transcription de certains gènes (Pham and Sauer, 2000). Les formes de H2A et H2B ubiquitinées ont également été retrouvées dans les loci actifs en transcription (Jason et al., 2002).

Un travail plus récent a toutefois montré que les deux processus contraires d'ubiquitination et de dé-ubiquitination sont impliqués dans l'activation de la transcription, et que la sous-unité Ubp8 du complexe SAGA est douée d'une activité de dé-ubiquitination de l'histone H2B (Wyce et al., 2004). Le fait que l'ubiquitination et la dé-ubiquitination soient tous deux impliqués dans l'activation de la transcription paraît assez surprenant au vu des autres modifications post-traductionnelles dont les effets s'opposent la plupart du temps (acétylation/désacétylation). Quoiqu'il en soit, l'ubiquitination des histones participe à la régulation de la transcription.

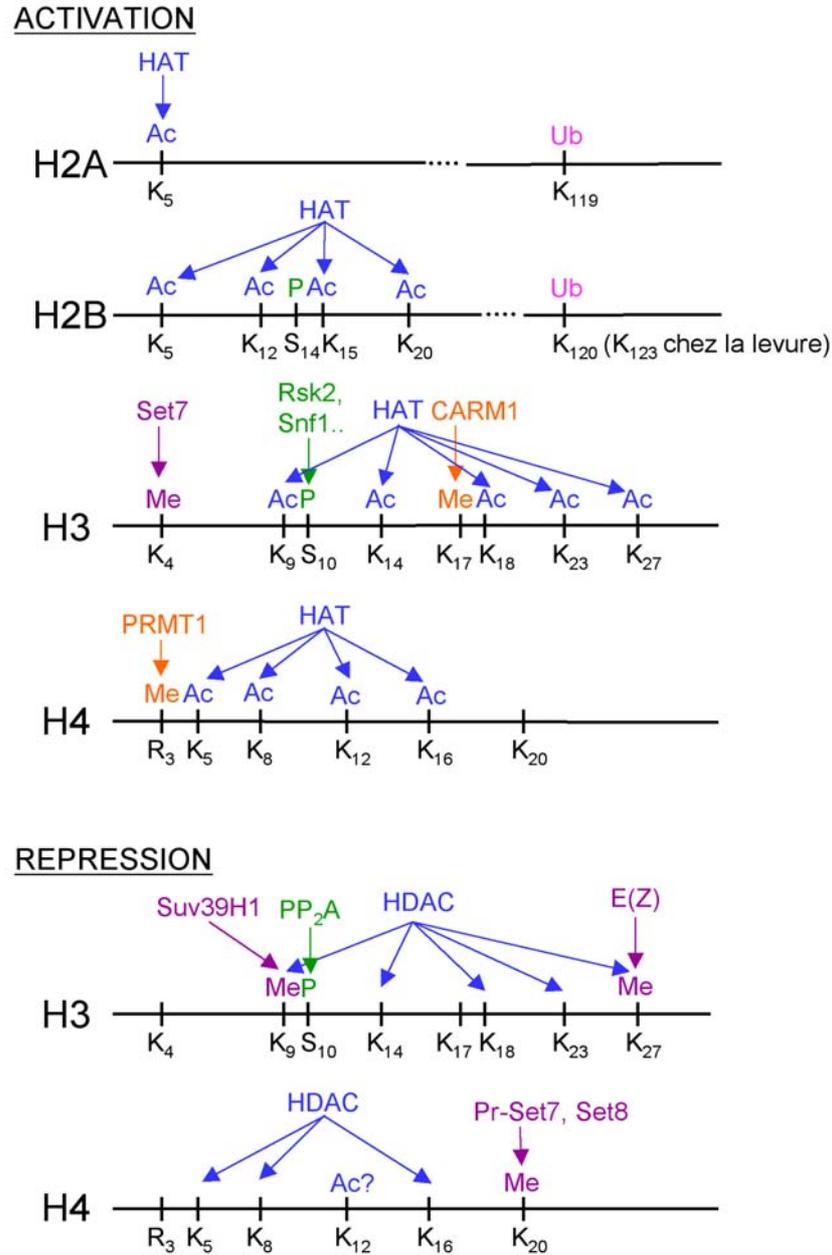


Figure 18 : Représentation schématique de différentes modifications post-traductionnelles au niveau de l'extrémité N-terminale des histones.

Les groupes de protéines responsables des modifications sont représentés en haut des flèches. Certaines modifications post-traductionnelles sont favorables à l'activation de la transcription, tandis que d'autres marquent des régions inactives en transcription.

3.4.4 – Conséquences des modifications post-traductionnelles de l'extrémité N-terminale des histones

3.4.4.1 – Reconnaissance des modifications post-traductionnelles sur l'extrémité N-terminale des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones marquent diverses régions de la chromatine. A l'heure actuelle, des modules protéiques capables de reconnaître ces modifications ont été identifiés, comme les bromodomaines ou bien les chromodomaines (de la Cruz et al., 2005). Ainsi, certaines protéines reconnaîtront spécifiquement ces modifications post-traductionnelles sur les queues des histones et elles peuvent influencer positivement ou négativement la transcription. La découverte de ces domaines conforte l'hypothèse du « code des histones ».

Les résidus lysines **acétylés** peuvent par exemple être reconnus par un motif d'environ 110 résidus appelé « **bromodomaine** ». Beaucoup de facteurs qui influent sur la structure chromatiniennne sont dotés de ce domaine très conservé, comme GCN5, PCAF, p300/CBP, TAF1, ainsi que les protéines de la famille de SWI/SNF2 (pour revue, (Loyola and Almouzni, 2004)). Les prédictions de structure secondaire suggèrent que le domaine BrD puisse former une surface d'interaction entre protéines (Haynes et al., 1992). Par exemple, il a été démontré que le complexe SWI/SNF ne se lie à la chromatine qu'après l'acétylation des histones opérée par SAGA ou NuA4, et que cette liaison est dépendante du bromodomaine de Swi2/Snf2 (Hassan et al., 2002). Ainsi le bromodomaine lie les lysines acétylées et joue donc un rôle majeur dans le recrutement de cofacteurs au niveau d'histones acétylées.

De la même manière, les protéines à « **chromodomaine** » sont capables de reconnaître spécifiquement la lysine 9 **méthylée** de H3 (HP1, Pdd1, Suv39H1). Ceci a permis de commencer à comprendre les mécanismes par lesquels la méthylation de la lysine 9 de H3 réprime la transcription. En effet, le chromodomaine de HP1 permet la liaison de HP1 sur ces lysine 9 méthylées, ce qui provoque le recrutement d'une déacétylase, probablement capable de déacétyler les histones voisines.

Des études récentes ont par ailleurs montré que le chromodomaine de la protéine Chd1 (*chromo-ATPase/helicase DNA binding Domain 1*) reconnaît spécifiquement la lysine 4 méthylée au niveau de l'histone H3, qui, elle, est associée à une transcription active (Pray-Grant et al., 2005).

Ainsi les « chromodomaines » sont capables de reconnaître spécifiquement les histones méthylées et d'influencer l'environnement de la chromatine (recrutement de HDAC ou de HAT) ce qui conduit à une répression ou à une activation de la transcription.

Un autre type de domaine protéique est capable de reconnaître spécifiquement les histones, c'est le **domaine SANT**, présent dans les protéines telles que ADA2 (sous-unité du complexe SAGA), ou bien chez la levure, Sw3p, Rsc8p, BAF155/170 (sous-unités présentes dans les complexes remodelant la chromatine en présence d'ATP). Contrairement au bromodomaine ou au chromodomaine, les domaines SANT peuvent interagir avec les histones non modifiés. Il est intéressant de noter que les complexes SAGA dont le domaine SANT de ADA2 a été délété, montrent une capacité réduite à lier les histones non-acétylées, et s'avèrent incapables d'acétyler les nucléosomes dans un test d'acétylation *in vitro* (Sternier

et al., 2002b). Même si le domaine SANT ne reconnaît pas de modification post-traductionnelle particulière sur la queue des histones, il participe à la reconnaissance des histones, et au recrutement du complexe SAGA qui à son tour acétylera l'extrémité N-terminale des histones.

Ainsi certains cofacteurs transcriptionnels sont dotés de domaines protéiques qui interagissent spécifiquement avec certaines modifications post-traductionnelles des histones. Les modifications post-traductionnelles des histones prennent ainsi place dans la cascade d'activation qui aboutit à la transcription de gènes spécifiques. Ces modifications sont constamment mises en place, maintenues, puis supprimées par toute une panoplie d'enzymes, soulignant le caractère dynamique de ce processus. On pense par exemple que l'acétylation des histones est une suite de cycles continus d'acétylation et de déacétylation, avec un *turn over* de quelques minutes à quelques heures.

3.4.4.2 – Les modifications post-traductionnelles marquent différentes régions de la chromatine

Plus globalement, les modifications post-traductionnelles des histones marquent les régions de la chromatine actives ou inactives en transcription.

En général, les histones acétylées sont retrouvées dans les régions de la chromatine les plus sensibles à la DNase I, correspondant aux régions actives en transcription (Hebbes et al., 1988), ou bien aux régions de chromatine prêtes à la transcription (Struhl, 1998). A l'inverse les régions où l'ADN est méthylé et où les histones sont hypoacétylées, sont en général inactives en transcription.

Dans le noyau, les gènes actifs sont localisés d'une manière diffuse dans les territoires où la chromatine est faiblement compactée, généralement au centre du noyau, alors que les gènes inactifs sont localisés dans l'hétérochromatine, généralement en périphérie du noyau.

De nombreuses expériences ont montré que les gènes actifs en transcription sont principalement exclus des régions de la chromatine condensée (Cmarko et al., 1999 ; Verschure et al., 1999). De plus, la plupart des gènes (mais pas tous) associés à l'hétérochromatine péricentromérique sont inactifs en transcription (Brown et al., 1999; Merckenschlager et al., 2004). Groudine *et al.* ont étudié la relation entre la localisation nucléaire et l'activation de la transcription du gène de la *β globine* dans les cellules érythroïdes. Avant la différenciation des cellules, le gène de la *β globine* est faiblement transcrit et s'associe préférentiellement avec l'hétérochromatine centromérique. Par contre, après différenciation, l'activation de la transcription du gène de la *β globine* est couplée avec la relocalisation du gène dans des régions de la chromatine distantes du centromère (Francastel et al., 2001). La localisation du gène pourrait influencer son activité transcriptionnelle.

Par ailleurs les régions de la chromatine actives en transcription coïncident généralement avec les régions où les histones se retrouvent acétylées.

Ainsi l'acétylation des histones permettrait non seulement le recrutement de cofacteurs de la transcription, mais aussi de marquer certaines régions de la chromatine actives en transcription.

L'acétylation des histones laisse présager une action plus globale des HATs, qui seraient impliquées dans des processus aussi divers que la progression du cycle cellulaire (Ait-Si-Ali et al., 1998; Clarke et al., 1999), la dynamique des chromosomes (Ekwall et al., 1997), la recombinaison de l'ADN, l'apoptose (Ikura et al., 2000) ou, comme nous pourrions le voir (chapitre 6.2.1.2), dans la réparation de l'ADN.

D'autres modifications post-traductionnelles des histones non décrites ici peuvent être couplées à divers mécanismes cellulaires. Ainsi nous allons voir que la phosphorylation du variant H2AX est associée à la réparation des DSBs (Chapitre 6.2.1.1).

4 – LES PROTEINES CAPABLES D'ACETYLER LES HISTONES SONT RETROUVEES AU SEIN DE COMPLEXES MULTIPROTEIQUES

Comme beaucoup d'histone acétylases recombinantes sont incapables d'acétyler les histones dans un contexte chromatinien *in vitro* (Grant et al., 1998a ; Ogryzko et al., 1998), on a pensé que la présence de facteurs additionnels peut être nécessaire au bon déroulement de l'acétylation des histones. La plupart des HATs natives existe au sein de complexes multiprotéiques, et l'incorporation de HATs à ces complexes est susceptible de modifier la spécificité de substrat de ces HATs.

4.1 – Association des protéines en complexes

Durant ces deux dernières décennies, de nombreuses méthodes biochimiques ont été mises au point pour isoler différents complexes multiprotéiques impliqués dans le processus de transcription.

L'isolement de nombreux complexes a permis de mettre en évidence la présence de sous-unités identiques au sein de complexes distincts. Ainsi les complexes hTFTC et TFIID partagent les TAFs, les complexes hTFTC et TIP60 partagent la sous-unité hTRRAP. Les complexes STAGA et TFTC possèdent les même sous-unités, exceptées quelques TAFs de haut poids moléculaire, absentes dans le complexe STAGA.

Les sous-unités de ces complexes multiprotéiques isolés biochimiquement s'associent de manière stable. Cependant, chaque complexe est formé de modules, ou sous-complexes, qui peuvent s'associer entres eux, et cette association est dynamique dans les cellules. Reste maintenant à savoir comment et pourquoi les sous-unités vont s'associer en complexes à un moment précis de la vie de la cellule.

De nombreuses approches fonctionnelles ont été envisagées pour comprendre le(s) rôle(s) de ces complexes dans les grands processus de la biologie moléculaire *in vitro* et *in vivo*.

Les approches *in vitro* consistent à tester les activités de transcription, d'activation de la transcription, de réparation et d'activité enzymatique des complexes purifiés.

Les approches *in vivo* s'avèrent beaucoup plus délicates puisqu'il est difficile de tester l'implication de plusieurs protéines d'un même complexe dans un phénomène cellulaire précis en s'assurant que ces protéines sont, à ce moment-là, associées sous forme de complexes. J'essayerai de décrire ces nouvelles approches et, à défaut de pouvoir décrire le rôle de complexes entiers, je décrirai les données fonctionnelles des protéines qui les composent.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des grands complexes doués d'activité HAT

| Complexe | SAGA | SLIK/SALSA/ SAGA-alt | PCAF | STAGA | TFTC | ADA | HAT- A2 | Elongateur | NuA4 | Tip60 | MSL | NuA3 | SAS (SAS-I) |
|--|------------------------|-------------------------------|--------|--------------------------------------|------------------|--------------|------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------|----------------|
| Organisme | levure | levure | humain | humain | humain | levure | levure | levure | levure | humain | mouche | levure | levure |
| Substrat | H3/H2B | H3/H2B | H3/H4 | H3/H2B | H3/H2B | H3/H2BH3/H2B | H3/H4 | H3/H4 | H4/H2A/H4/H2A | H4 K16 | H4 K16 | H3 | H4 K16 |
| Sous-unité HAT | yGcn5 | yGcn5 | PCAF | hGcn5L | hGcn5L | yGcn5 | yGcn5 | Elp3 | Esa1 | Tip60 | MOF | Sas3 | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Sas2 |
| | Tra1 | Tra1 | PAF400 | TRRAP | TRRAP | - | - | - | Tra1 | TRRAP | - | - | - |
| | yAda1 | yAda1 | - | STAF42 | - | - | - | - | Act1 | actine | - | - | - |
| | yAda2 | yAda2 | hAda2 | - | - | yAda2 | yAda2 | - | Arp4 | BAF53 | - | - | - |
| | yAda3 | yAda3 | hAda3 | STAF54 | hAda3 | yAda3 | yAda3 | - | Epl1 | EPCc | - | - | - |
| | yAda5/Spt20 | yAda5/Spt20 | - | - | - | - | - | - | Eaf3 | - | MSL3 | - | - |
| | ySpt3 | ySpt3 | hSpt3 | hSpt3 | hSpt3 | - | - | - | Yng2 | - | - | Yng1 | - |
| | ySpt7 (entier) | ySpt7 (troncature C-term.) | - | STAF65 γ | SPT7 | - | - | - | Yaf9 | - | - | Anc1/TAF30 | Sas5 |
| | YTAf5 | YTAf5 | - | - | hTAF5 | - | - | - | | | | | |
| | - | - | hTAF5L | hTAF5L | hTAF5L | - | - | - | | | | | |
| | YTAf6 | YTAf6 | - | - | hTAF6 | - | - | - | | | | | |
| | - | - | hTAF6L | hTAF6L | hTAF6L | - | - | - | | | | | |
| | YTAf9 | YTAf9 | hTAF9 | hTAF9 | hTAF9 | - | - | - | | | | | |
| | YTAf10 | YTAf10 | hTAF10 | hTAF10 | hTAF10 | - | - | - | | | | | |
| | YTAf12 | YTAf12 | hTAF12 | hTAF12 | hTAF12 | - | - | - | | | | | |
| | - | - | SAP130 | SAP130 | SAP130 | - | - | - | | | | | |
| | Sgf73 | - | - | - | Ataxine7 | - | - | - | | | | | |
| | Sgf11 | - | - | - | Ataxine7- L3? | - | - | - | | | | | |
| Sous-unités spécifiques au complexe | ySpt8 Sgf29 Ubp8 | Rtg2 | - | STAF36 STAF46 STAF55 STAF60 | hTAF2 hTAF4 | Ahc1 | - | Elp1 Elp2 Elp4 Elp5 Elp6 | Eaf1 Eaf2 Eaf5 Eaf6 | p400 Tip48 Tip49 | MLE MSL1 MSL2 roX RNA | - | Sas4 |

4.2 – Les complexes NuA4 et TIP60

L'acétylation des histones par TIP60 recombinante est largement réduite lorsque des histones agencées en nucléosomes sont utilisées comme substrat, ce qui peut indiquer un besoin de cofacteurs cellulaires pour assurer la fonction d'acétylation des histones *in vivo* (Yamamoto and Horikoshi, 1997).

TIP60 a été identifiée au sein d'un large complexe multiprotéique doué d'activité HAT sur les histones agencées en nucléosomes. Le complexe TIP60 a été purifié par l'équipe du Dr Nakatani en surexprimant une forme étiquetée de TIP60 dans les cellules HeLa (Ikura et al., 2000). Il existe un complexe homologue chez la levure : le complexe NuA4 (Allard et al., 1999). Ces deux complexes sont capables d'acétyler efficacement les histones H2A et H4 sous forme de nucléosomes *in vitro*.

Le complexe TIP60 humain comprend au moins 12 polypeptides dont la plupart ont des homologues dans le complexe NuA4 chez la levure (voir Tableau 2). Ainsi, on y retrouve TRRAP, homologue de Tra1, BAF53, homologue de Act3/Arp4, la β -actine, homologue de Act1, et EPC, l'homologue de EPL1. Cependant, la composition de ces complexes n'est pas complètement similaire, puisque certaines protéines n'ont été identifiées que dans le complexe NuA4 de la levure, comme les protéines RuvB-like, ATPases à activité hélicase (TIP48 et TIP49), ou bien la protéine p400 de la famille Swi/Snf à activité ATPase. Or, les homologues de ces trois protéines chez la levure, Swr1, Rvb1 et Rvb2, sont elles-mêmes retrouvées au sein d'un complexe multiprotéique nommé SWR1. Ainsi le complexe TIP60 humain correspond à la fusion parfaite de deux complexes chez la levure, le complexe NuA4 et le complexe SWR1 (Doyon et al., 2004).

Malgré ces quelques différences en composition, les complexes TIP60 humain et NuA4 de levure restent très homologues au niveau structural, suggérant une(des) homologie(s) fonctionnelle(s).

4.2.1 – Etudes fonctionnelles du complexe TIP60

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur le rôle de la protéine TIP60, cette protéine peut aussi bien activer qu'inhiber la transcription. Cependant, on ne connaît toujours pas sa spécificité de substrat *in vivo*, difficilement étudiable car les cellules KO pour TIP60 ne sont pas viables (Doyon et al., 2004). A ce jour, si de nombreuses données fonctionnelles sont disponibles sur la protéine TIP60, les études concernant le complexe entier (avec l'étude de plusieurs sous-unités protéiques) sont plus rares.

4.2.1.1 – Le complexe TIP60 et l'activation de la transcription

Peu d'informations sont disponibles à propos des cibles endogènes de TIP60. Plusieurs gènes ont toutefois été proposés comme cible de TIP60, comme le gène *MnSOD* (Creaven et al., 1999), ou bien le gène *kall* (Baek et al., 2002b). Grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, les auteurs ont visualisé le recrutement de TIP60 sur le site de liaison à NF κ B du promoteur du gène *kall* en réponse à l'interleukine 1 β . Curieusement, si hTRRAP est recrutée au niveau de ce promoteur, ce n'est pas le cas de

BAF53 et de TIP49 : dans ce cas, le complexe TIP60 entier ne semble pas primordial pour activer la transcription.

Selon d'autres études, plusieurs protéines du complexe TIP60 sont impliquées dans la transformation par l'oncogène c-myc (TIP48, TIP49 et hTRRAP), ce qui suggère que ce complexe aurait un rôle dans l'activation de la transcription par c-myc : par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, on a observé le recrutement de ces protéines au niveau de promoteurs de gènes dont la transcription est induite par c-myc (Frank et al., 2003). D'autres études en ChIP suggèrent une implication du complexe TIP60 dans l'activation de la transcription, puisque E2F recrute plusieurs sous-unités du complexe TIP60 *in vivo* au niveau des promoteurs des gènes cibles de E2F (Taubert et al., 2004).

Ainsi plusieurs sous-unités des complexes TIP60 sont impliquées dans des processus communs, ce qui accorde la réalité fonctionnelle de ce complexe *in vivo*.

4.2.1.2 – Le complexe TIP60 et la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Lorsque la purification du complexe TIP60 a été réalisée, des enzymes telles que TIP48 et TIP49 ont été identifiées. Ces protéines possèdent des activités enzymatiques un peu particulières, comme les activités hélicases (activité ATPase ssDNA-dépendante). Leur homologue bactérien RuvB catalyse la migration de branche des jonctions de Holliday pendant la recombinaison homologue. Le complexe bactérien RuvAB prévient l'apparition de lésions doubles-brins de l'ADN au niveau des fourches de réplication, ce qui montre une implication probable de ces protéines dans la réparation de l'ADN. Après l'identification de TIP48 et TIP49 comme membres du complexe TIP60, l'équipe du Dr Nakatani propose que le complexe TIP60 entier joue un rôle dans la réparation de l'ADN. Ils ont tout d'abord montré que le complexe possède une activité hélicase ainsi qu'une activité ATPase et qu'il fixe les jonctions de type Holliday avec une haute affinité. Enfin, ils ont montré que des mutants dont le domaine HAT de TIP60 est délété perdent leur capacité à entrer en apoptose et ne réparent plus efficacement les cassures double-brin de l'ADN. Le complexe TIP60 est donc probablement impliqué dans la réparation de l'ADN. Par la suite, l'équipe du Dr Workman, en étudiant le complexe TIP60 chez la drosophile, a montré que l'équivalent du complexe TIP60 est capable de reconnaître l'histone variant H2av phosphorylé après irradiation, de l'acétyle, et facilite son échange avec une histone classique (Kusch et al., 2004). Ces études confirment l'implication de TIP60 dans la réparation des DSBs.

4.2.2 – Etudes fonctionnelles du complexe NuA4

In vivo, ce complexe acétyle l'histone H4 de nucléosomes situés sur des promoteurs spécifiques, comme *Ino1*, *pho5*, mais semble aussi intervenir dans l'acétylation plus globale des histones H4 sur le génome (Bird et al., 2002). Une partie du complexe, nommé piccolo NuA4, composée des protéines Epl1, Yng2 et Esa1, est hautement active et préfère les nucléosomes aux histones libres comme substrat (Boudreault et al., 2003). Son HAT, Esa1, acétyle la majorité de l'histone H4 dans le génome de levure : la mutation du domaine HAT

de Esa1 conduit en effet à une perte drastique de H4 acétylée à température restrictive (Clarke et al., 1999).

4.2.2.1 – NuA4 et l'activation de la transcription

Des expériences de transcription *in vitro*, en utilisant de la chromatine reconstituée, ont permis de mettre en évidence la capacité de NuA4 à activer la transcription. Elles ont été réalisées en utilisant une matrice d'ADN comprenant 5 sites de liaison à Gal4 et un promoteur adénoviral E4 flanqué de chaque côté de 5 répétitions de l'ADN5S. Cette matrice a été assemblée en nucléosomes et incubée avec Gal4-VP16, puis avec NuA4 en présence d'acétyl CoA, ce qui a conduit à activer la transcription (Allard et al., 1999 ; Ikeda et al., 1999 ; Vignali et al., 2000). Ainsi NuA4 en acétylant les histones, active la transcription *in vitro* grâce à son recrutement sur les sites Gal4 par un activateur, ici Gal4-VP16.

In vivo, des mutations du complexe NuA4 provoquent des défauts dans l'expression de certains gènes. Chez la levure, une analyse globale des régions promotrices du génome liant Esa1 (« *ChIP on chip* »), a permis d'identifier une trentaine de promoteurs de levure associés à Esa1, dont la plupart contrôle l'expression de protéines ribosomales (Reid et al., 2000).

En outre, *in vivo*, le complexe NuA4 est impliqué dans l'activation de la transcription de certains gènes dont *his4*, *pho5* et *lys2*. Plusieurs mutants de certaines sous-unités du complexe NuA4, comme Yng2, Esa1, Eaf3p, Act3, ont montré un défaut d'expression des gènes *his4*, *pho5* et *lys2* (Choy et al., 2001 ; Eisen et al., 2001; Galarneau et al., 2000). Nous ne connaissons pas encore bien les gènes cibles du complexe NuA4. Même si les promoteurs des gènes ribosomiques semblent spécifiquement lier Esa1, la fonction d'acétylation des histones H4 par TIP60 semble s'effectuer de façon globale sur l'ensemble du génome.

4.2.2.2 – NuA4 et la réparation des dommages à l'ADN

Après la mise en évidence d'une participation de la protéine Tip60 à la réparation des DSB, plusieurs groupes ont suggéré une implication indirecte de Tip60 dans la réparation : on pensait alors que Tip60 modulait la transcription de certains gènes, suite à l'induction de cassures d'ADN. Par la suite, il a été montré qu'en fait, l'activité HAT de Tip60 est directement requise pour la réparation des cassures d'ADN par le processus de NHEJ et la réparation couplée à la réplication (Bird et al., 2002 ; Choy and Kron, 2002). Les cellules mutées pour certaines sous-unités du complexe NuA4, comme Esa1, Epl1 ou Yng2, sont plus sensibles aux agents induisant des cassures d'ADN que les cellules normales. Bird *et al.* ont également montré qu'une sous-unité du complexe NuA4, Arp4, est recrutée *in vivo* au niveau des sites de cassures de l'ADN. Ainsi le complexe de levure NuA4 semble lui aussi impliqué dans la réparation des DSB, tout comme le complexe TIP60 humain.

4.2.3 – Complexes NuA4 et TIP60 impliqués dans la transcription et la réparation des cassures d'ADN

La composition des complexes multiprotéiques est presque intégralement conservée de la levure (complexe NuA4) à l'homme (complexe TIP60 humain). NuA4 et TIP60 sont impliqués dans des fonctions cellulaires nombreuses et proches.

Les fonctions directes du complexe NuA4 dans la réparation de l'ADN sont mieux établies depuis la découverte de la présence de certaines sous-unités au niveau de sites de cassures, et de la mise en évidence du rôle que Tip60 joue dans l'acétylation de H2AX phosphorylée après induction de DSB.

Cependant, ces études n'excluent pas que TIP60 participe à l'activation de la transcription de gènes eux-même impliqués dans la réparation des cassures d'ADN.

4.3 – Le complexe Médiateur

Ce complexe multiprotéique s'impose comme un cofacteur de la transcription important, mais n'est pas doué d'activité d'acétylation. Cependant, il sera décrit car il se lie à l'activateur GAL4-VP16 utilisé dans la publication 1.

Chez la levure, ce complexe de 1-2 Mda a été isolé en association avec l'ARN polymérase II. Il contient de nombreuses sous-unités nommées MED1 à MED31 (Bourbon et al., 2004 ; Conaway et al., 2005 ; Sato et al., 2004). La plupart de ces sous-unités ont été identifiées grâce à leurs interactions avec des activateurs ou avec l'ARN polymérase II (Liao et al., 1995 ; Myers et al., 1999). Ainsi ce complexe Médiateur peut servir de lien, entre les activateurs et l'ARN polymérase II, lors de l'activation de la transcription.

Chez l'humain, deux complexes de type Médiateur en interaction avec l'activateur VP16 ou bien avec SREBP (*Sterol-Responsive Enhancer Binding Proteine*) ont pu être isolés (Myers et al., 1999; Taatjes et al., 2002), et leurs structures déterminées par microscopie électronique (Naar et al., 2002; Taatjes et al., 2002) :

- l'un, grand de 2 MDA, désigné **ARC-L** qui ressemble aux complexes TRAP (*Thyroid hormon Receptor (TR)-Associated Protein*), DRIP (*vitamin D Receptor (VDR) Interacting Protein*), ARC (*Activator Recruited Cofactor*), SMCC (*SRB/MED containing Cofactor Complexes*) ou encore NAT (*Negative regulator of Activated Transcription*). Ce complexe est composé des sous-unités suivantes : MED1, MED4, MED6, MED7, MED8, MED10, MED12, MED13, MED14, MED15, MED16, MED17, MED21, MED23, MED24, MED25, MED26, CDK8 et CycC.
- l'autre, plus petit, de 500 KDa, nommé **CRSP** (*Cofactor Required for Sp1*) (Malik and Roeder, 2000). Ce complexe est composé des sous-unités suivantes : MED7, MED14, MED17, MED23, MED24, MED26 et MED27.

Le grand complexe n'est pas capable de médier l'activation de la transcription de promoteurs répondant à SREBP, au contraire du petit complexe SRSP, ce qui est surprenant. En outre, des études chez la levure ont montré que certaines sous-unités du complexe ARC-L, comme CDK8 ou CycC, sont impliquées dans la répression de la transcription de certains

gènes (Lewis and Reinberg, 2003). Ces résultats suggèrent que le complexe CRSP aurait des fonctions coactivatrices, et le complexe ARC-L des fonctions inhibitrices. Mais ces interprétations sont basées sur des études *in vitro*, qui ne reflètent sans doute pas le rôle réel de ces deux complexes *in vivo*.

4.3.1 – Structure des complexes de type Médiateur

Le complexe Médiateur chez la levure s'agence en plusieurs modules distincts, le module 1 (MED20, MED17, MED18, MED22, MED19, MED8, MED11 et MED6), le module 2 (MED15, MED14, MED16, MED3 et MED2), et le module 3 (MED1, MED4, MED7, MED21, MED9 et MED10).

La structure du complexe Médiateur tant chez l'homme que chez la levure a été déterminée par microscopie électronique. La structure du complexe ARC-L (Naar et al., 2002; Taatjes et al., 2002) ressemble à celle du Médiateur chez la levure et du complexe TRAP humain (Dotson et al., 2000), et comprend une tête, un corps et une queue (voir Figure 19). Le complexe SRSP s'en différencie par l'absence de la tête. Il est intéressant de constater que, chez la levure, le complexe Médiateur en présence de l'ARN polymérase II présente une structure plus allongée (Asturias et al., 1999).

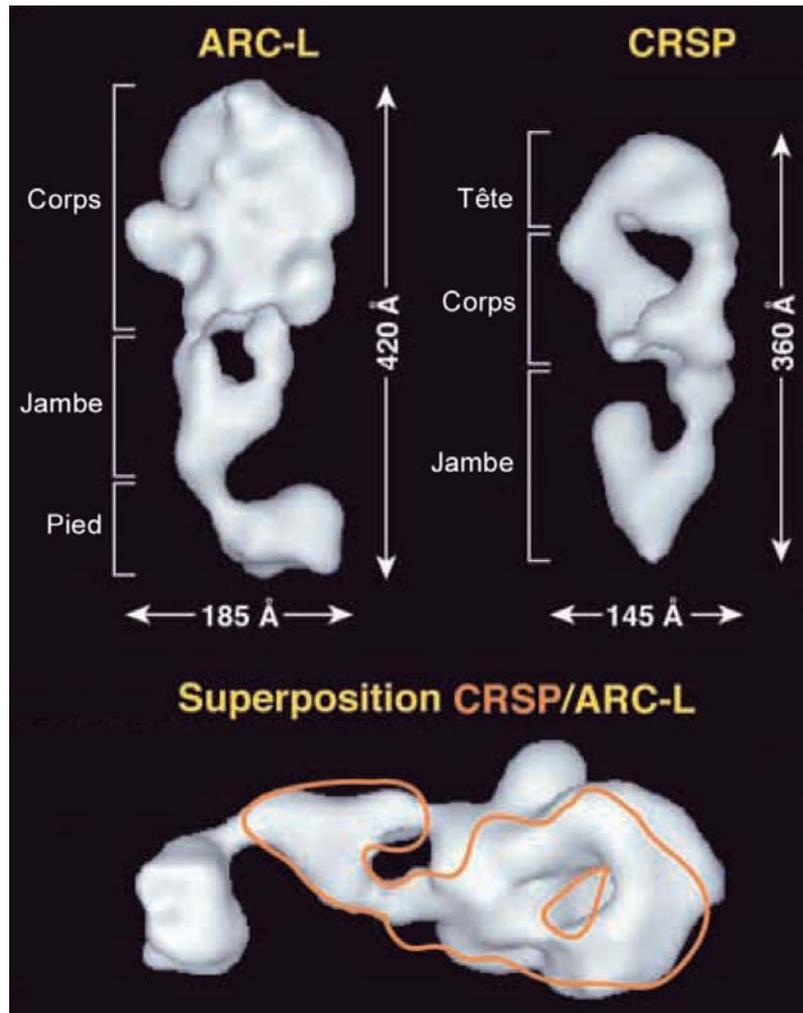


Figure 19 : Structure tridimensionnelle du complexe Médiateur résolue par microscopie électronique, d'après (Lewis and Reinberg, 2003).

Images prises par microscopie électronique des complexes ARC-L et CRSP qui illustrent la taille et les différences structurales entre les deux complexes.

4.3.2 – Implication du complexe Médiateur dans l'activation de la transcription par GAL4-VP16

Tout d'abord, des expériences d'interaction *in vitro* ont montré que le complexe Médiateur peut se lier à GAL4-VP16 (Ito et al., 1999a). *In vitro*, le complexe Médiateur facilite l'activation de la transcription par GAL4-VP16 sur de l'ADN nu alors que les TAFs ne semblent pas être impliquées dans ce processus (Oelgeschlager et al., 1998; Wu et al., 2003). Toutefois, d'autres études prouvent que GAL4-VP16 favorise la liaison de TBP et de TAF1 au niveau du promoteur (Iratni et al., 2002), indiquant la présence de TFIID.

In vivo, les cellules des souris $MED1^{-/-}$ et $MED23^{-/-}$ sont autant compétentes que les souris *wt* pour l'activation de la transcription par VP16 (Ito et al., 2000a ; Stevens et al., 2002), ce qui indique que ces sous unités ne participent pas à la stimulation de la transcription par VP16. En fait, c'est la sous-unité MED17 qui semble interagir directement avec VP16. Ainsi lorsque MED1 et MED23 sont absentes des cellules, VP16 peut toujours recruter le

complexe Médiateur *via* MED17. Chez la levure, des mutations dans MED2, MED3 et MED16 génèrent des cellules dans lesquelles l'activation de la transcription par VP16 est perturbée (Lee et al., 1999). Désormais, l'intervention du complexe Médiateur dans l'activation de la transcription par GAL4-VP16 n'est plus à mettre en doute.

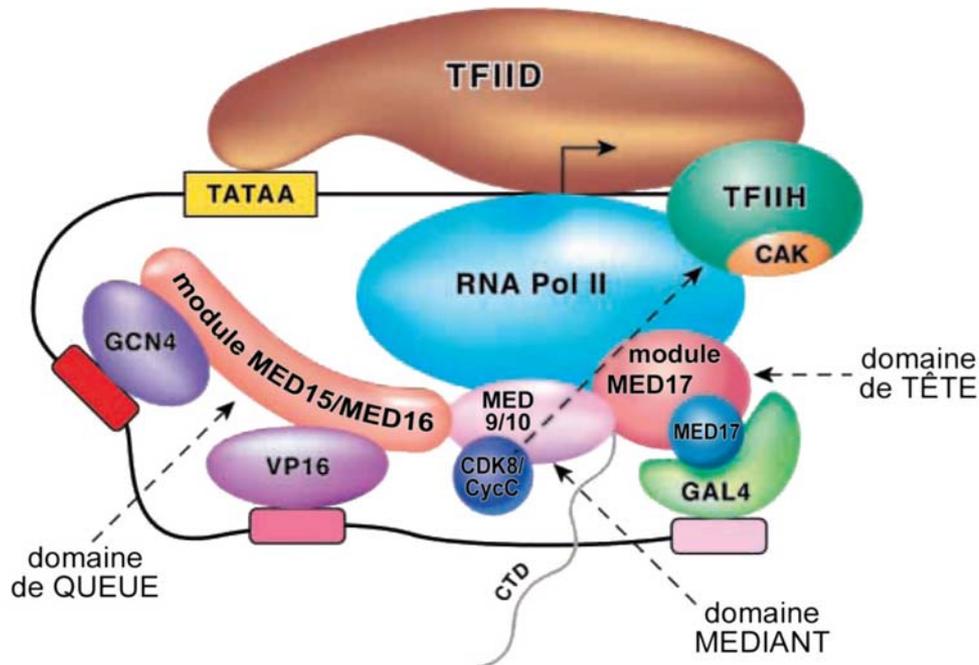


Figure 20 : Le complexe Médiateur : modèle d'activation de la transcription par les activateurs VP16, GCN4 et GAL4, d'après (Lewis and Reinberg, 2003).

Ce schéma représente un promoteur hypothétique avec une boîte TATA, sur laquelle se fixe le complexe TFIID. Des contacts entre TFIID et le site d'initiation et des séquences en aval du site d'initiation ont également été représentés. Trois activateurs, GCN4, VP16 et GAL4 se fixent sur leurs séquences spécifiques. Les sous-unités du complexe Médiateur qui interagissent directement avec ces activateurs ont été représentées. Les trois domaines du Médiateur, tête, corps et queue sont indiqués.

4.3.3 – Liaison des complexes Médiateur avec l'ARN polymérase II

Les études fonctionnelles des complexes de type Médiateur dans des systèmes *in vitro* ont permis de suggérer un rôle de lien moléculaire entre la polymérase II et les activateurs. Des études *in vivo*, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, suggèrent des fonctions plus diverses pour les complexes de type Médiateur. Tout d'abord, l'ARN polymérase II n'est pas forcément recrutée en même temps que les sous-unités du Médiateur sur le promoteur de levure HO (Cosma et al., 1999). Ensuite, la liaison de l'ARN polymérase et des sous-unités du complexe Médiateur n'est pas toujours concomitante à l'initiation de la transcription (Soutoglou and Talianidis, 2002). Ces études suggèrent que les cofacteurs transcriptionnels peuvent se lier sur des promoteurs particuliers à différents moments après liaison de l'activateur. Le même complexe de protéines peut se lier dans un ordre différent selon l'environnement créé par le promoteur.

4.3.4 – Le complexe Médiateur et le complexe TFIID : Redondance ou synergie ?

Si dans quelques cas particuliers les TAFs et le complexe Médiateur ne sont pas tous deux requis pour activer la transcription, on peut dire en général que les TAFs et le complexe Médiateur agissent en coopération pour augmenter le niveau global d'activation de la transcription (Baek et al., 2002a ; Johnson et al., 2002). Il a même été proposé que le complexe Médiateur soit nécessaire au niveau basal dans un système de transcription *in vitro*. Il est possible d'imaginer des fonctions assez proches pour les complexes TFIID ou de type Médiateur (Lewis and Reinberg, 2003).

4.4 – Le complexe hTFIID

Le laboratoire du Dr.TORA travaille depuis longtemps sur ce complexe multiprotéique, et notamment sur les protéines qui le composent, les TAFs. Ce complexe est formé de la protéine TBP et de 14 facteurs qui lui sont associés (TAFs), et contient une protéine douée **d'activité enzymatique HAT**, la protéine TAF1. La structure tridimensionnelle de ce complexe a été résolue par microscopie électronique et certaines sous-unités immunolocalisées (Leurent et al., 2004; Leurent et al., 2002).

Suite à la purification du complexe TFIID, des études *in vitro* ont proposé que le complexe TFIID participe à la formation du complexe de préinitiation ainsi qu'à l'activation de la transcription. Dès cette époque, plusieurs populations de complexes TFIID, doués de capacité différentes à activer la transcription *in vitro*, ont pu être isolées (Brou et al., 1993), ce qui suggère que la composition de ces complexes multiprotéiques est hétérogène.

Après avoir décrit quelques découvertes fonctionnelles sur TBP et les TAFs, je discuterai de l'implication possible de TFIID dans les modifications de la structure de la chromatine.

4.4.1 – TBP/TFIID

4.4.1.1 – Structure et liaison à l'ADN

La structure cristallographique de la protéine TBP associée à l'ADN a été déterminée (Kim and Burley, 1994)(Figure 21). Cette protéine possède une structure pseudosymétrique en forme de selle à cheval, avec une face concave qui interagit avec l'ADN, et une face convexe indispensable à l'interaction avec les TAFs. La liaison de TBP à l'ADN induit une très forte distorsion de l'ADN de telle sorte que le petit sillon de l'ADN est complètement ouvert, alors que le grand sillon est replié sur lui-même (Nikolov et al., 1995; Tan et al., 1996). La structure entière du complexe TFIID a pu être résolue à 3,5 nm par microscopie électronique (Brand et al., 1999a ; Leurent et al., 2002). La structure présente trois lobes reliés par de fines connexions. L'immunolocalisation de TAF1, TAF5, TBP et TAF7, montre que TAF1 et TAF5 sont localisées à des positions clés à la jonction des lobes du complexe (Leurent et al., 2004).

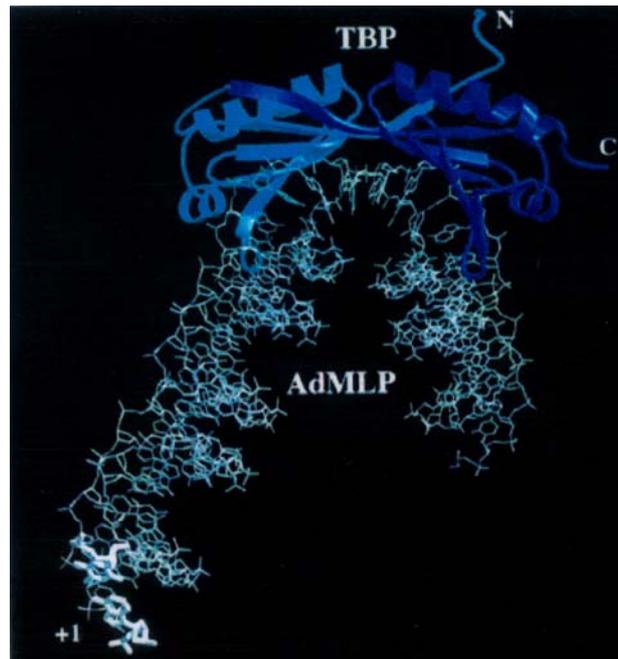


Figure 21 : Structure de TBP lié à l'ADN, d'après (Nikolov et al., 1996)

TBP est représenté en bleu et l'ADN en blanc. Le site d'initiation +1 est indiqué. Les parties N- et C-terminales des répétitions directes de TBP sont en bleu clair et foncé respectivement.

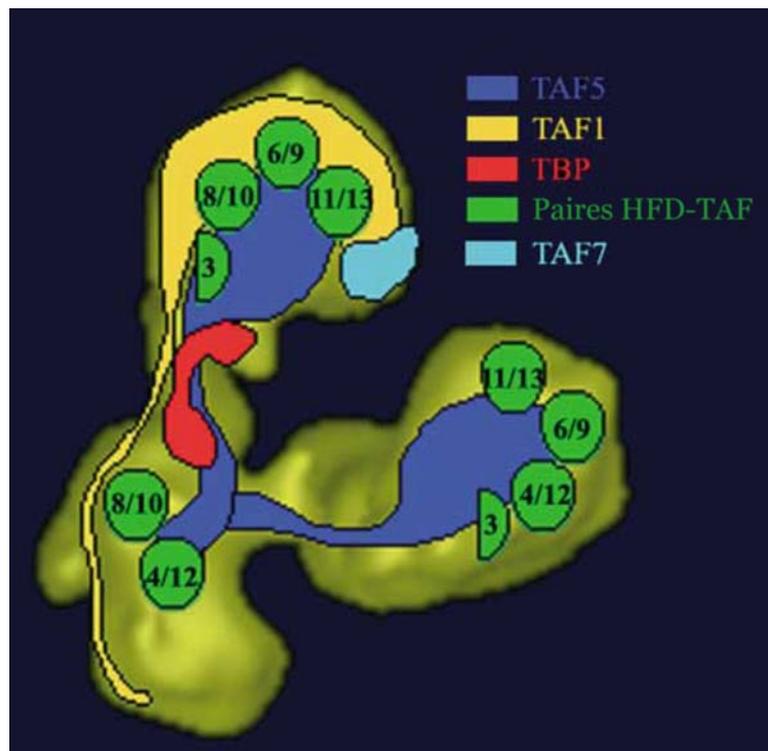


Figure 22 : Immunolocalisation des TAFs dans γ TFIID par microscopie électronique, d'après (Leurent et al., 2004 ; Leurent et al., 2002).

La localisation des paires de TAFs (contenant des domaines de repliement du type de celui des histones) est représentée avec des cercles verts. La présence de TAF1 et TAF5 s'étend aux deux lobes. La taille et l'aire colorée ne sont pas proportionnelles à la masse des protéines.

La liaison du complexe TFIID à l'ADN est souvent restreinte à la boîte TATA, mais pour quelques promoteurs elle peut s'étendre à des régions en aval de la boîte TATA, et au niveau du site d'initiation du promoteur Ad2ML. La liaison de TFIID en aval de la boîte TATA peut jouer un rôle important dans l'activation de la transcription. Certaines expériences montrent en effet que cette interaction peut être induite par des activateurs transcriptionnels (Chi et al., 1995; Lieberman and Berk, 1994).

4.4.1.2 – Fonctions de TBP

Bien que dans certains systèmes *in vitro*, l'activation de la transcription nécessite la présence du complexe TFIID entier (Dymlacht et al., 1991; Pugh and Tjian, 1990), dans d'autres cas, TBP suffit à lier des activateurs transcriptionnels comme GAL4-VP16 (Ingles et al., 1991; Oelgeschlager et al., 1998; Stringer et al., 1990). Ainsi, TBP est indispensable à la transcription de nombreux gènes qui n'impliquent pas forcément la présence des TAFs. Par exemple, l'activation de la transcription par les hormones thyroïdiennes n'est pas perturbée par l'absence de TAFs (Fondell et al., 1996b).

D'autre part, *in vitro*, il a été démontré que sur certains types de promoteurs, TBP est suffisante pour initier la transcription en présence d'autres facteurs généraux de la transcription (Peterson et al., 1990). La protéine TBP semble impliquée dans la transcription de nombreux gènes. L'implication plus générale de cette protéine dans l'expression des gènes chez la levure a été étudiée (« *ChIP on Chip*»). Les modulations de quantité de la plupart des transcrits ont été directement corrélées à des changements dans le recrutement de TBP au niveau du promoteur, ce qui souligne l'importance de ce facteur pour initier la transcription des gènes (Kim and Iyer, 2004). Par ailleurs, TBP peut participer à la transcription des gènes de classe I et III s'il est présent au sein de complexes protéiques différents de TFIID.

Ainsi, TBP semble jouer un rôle de premier ordre dans l'initiation de la transcription de nombreux gènes, notamment ceux dont le promoteur possède une boîte TATA (Lescure et al., 1994).

Certaines expériences chez les vertébrés ont souligné l'importance du facteur TBP dans la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. En bref, ces études montrent que l'absence de TBP est associée à une réduction de la croissance cellulaire et à une augmentation de l'apoptose (Um et al., 2001), alors que sa surexpression conduit à la transformation oncogénique des cellules (Johnson et al., 2003).

La protéine TBP compte plusieurs homologues qui sont exprimés dans des tissus particuliers. Chez la drosophile, **TRF1** est retrouvée dans les tissus neuronaux par exemple ainsi que dans le développement des organes reproducteurs (Hansen et al., 1997). **TRF2**, un autre homologue de la protéine TBP est impliqué dans la spermatogénèse. En effet, les souris TRF2^{-/-} sont viables mais stériles, car la spermatogénèse est arrêtée (Martianov et al., 2001)(pour revue, (Davidson, 2003; Muller and Tora, 2003)).

Si TBP est essentielle à l'initiation de la transcription, son rôle n'est toutefois pas universel : *in vivo*, TBP et ses homologues sont impliqués dans des mécanismes particuliers.

4.4.2 – Les Tafs

Ces protéines TAFs, remarquées pour leur association avec la protéine hTBP « *TBP Associated Factors* » dans les complexes hTFIID, ont également la possibilité de s'associer avec d'autres protéines indépendamment de la protéine hTBP, pour former alors de nouveaux complexes tels que TFTC, STAGA, PCAF ou SAGA. Pour unifier la nomination des TAFs clonées chez la levure, chez l'homme, chez la drosophile ou encore chez *C.elegans*, une nouvelle nomenclature a été adoptée par la communauté scientifique en 2002 et c'est celle à laquelle nous nous référerons ici (Tora, 2002) (voir Tableau 3).

Tableau 3 : Nouvelle nomenclature des TAFs, d'après (Tora, 2002)

| Nouveau nom | <i>H. sapiens</i> (hs) | <i>D. melanogaster</i> (dm) | <i>C. elegans</i> (ce) | | <i>S. cerevisiae</i> (sc) | <i>S. pombe</i> (sp) |
|----------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | précédent nom | nouveau nom | | |
| TAF1 | TAF _{II} 250 | TAF _{II} 230 | <i>taf-1</i> (W04A8.7) | <i>taf-1</i> | Taf145/130 | TAF _{II} 111 |
| TAF2 | TAF _{II} 150 | TAF _{II} 150 | <i>taf-2</i> [Y37F11B.4] | <i>taf-2</i> | Taf150 or TSM1 | (T38673) |
| TAF3 | TAF _{II} 140 | TAF _{II} 155 or BIP2 | (C11G6.1) | <i>taf-3</i> | Taf47 | |
| TAF4 | TAF _{II} 130/135 | TAF _{II} 110 | <i>taf-5</i> [R119.6] | <i>taf-4</i> | Taf48 or MPT1 | (T50183) |
| TAF4b | TAF _{II} 105 | | | | | |
| TAF5 | TAF _{II} 100 | TAF _{II} 80 | <i>taf-4</i> [F30F8.8] | <i>taf-5</i> | Taf90 | TAF _{II} 72 |
| TAF5b | | | | | | TAF _{II} 73 |
| TAF5L | PAF65β | Cannonball | | | | |
| TAF6 | TAF _{II} 80 | TAF _{II} 60 | <i>taf-3.1</i> (W09B6.2) | <i>taf-6.1</i> | Taf60 | (CAA20756) |
| TAF6L | PAF65α | (AAF52013) | <i>taf-3.2</i> [Y37E11AL.8] | <i>taf-6.2</i> | | |
| TAF7 | TAF _{II} 55 | (AAF54162) | <i>taf-8.1</i> [F54F7.1] | <i>taf-7.1</i> | Taf67 | TAF _{II} 62/PTR6 |
| TAF7L | TAF2Q | | <i>taf-8.2</i> [Y111B2A.16] | <i>taf-7.2</i> | | |
| TAF8 | (BAB71460) | Prodos | (ZK1320.12) | <i>taf-8</i> | Taf65 | (T40895) |
| TAF9 | TAF _{II} 32/31 | TAF _{II} 40 | <i>taf-10</i> [T12D8.7] | <i>taf-9</i> | Taf17 | (S62536) |
| TAF9L | TAF _{II} 31L (AAG09711) | | | | | |
| TAF10 | TAF _{II} 30 | TAF _{II} 24 | <i>taf-11</i> [K03B4.3] | <i>taf-10</i> | Taf25 | (T39928) |
| TAF10b | | TAF _{II} 16 | | | | |
| TAF11 | TAF _{II} 28 | TAF _{II} 30β | <i>taf-7.1</i> [F48D6.1] | <i>taf-11.1</i> | Taf40 | (CAA93543) |
| TAF11L | | | <i>taf-7.2</i> [K10D3.3] | <i>taf-11.2</i> | | |
| TAF12 | TAF _{II} 20/15 | TAF _{II} 30α | <i>taf-9</i> [Y56A4.3] | <i>taf-12</i> | Taf61/68 | (T37702) |
| TAF13 | TAF _{II} 18 | (AAF53875) | <i>taf-6</i> [C14A4.10] | <i>taf-13</i> | Taf19 or FUN81 | (CAA19300) |
| TAF14 | | | | | Taf30 | |
| TAF15 | TAF _{II} 68 | | | | | |
| <i>B-TFIID</i> | | | | | | |
| BTAF1 | TAF _{II} 170/TAF-172 | Hcl89B | (F15D4.1) | <i>btaf-1</i> | Mot1 | (T40642) |

4.4.2.1 – Structure en pseudonucléosomes

Les protéines TAFs possèdent des motifs de repliement de type histone, qui adoptent une structure semblable à celle des histones. Lorsque ces protéines s'associent, elles miment la structure du nucléosome et le remplacent sans perturber la périodicité de l'agencement histone-ADN (Hoffmann et al., 1996). Ainsi, il a été montré qu'une structure en pseudonucléosome composée de TAF6, TAF12, TAF9, TAF4, correspondant aux histones respectifs H4, H2B, H3 et H2A (Selleck et al., 2001), a plus d'affinité avec l'ADN que chacune des TAFs isolées (Shao et al., 2005).

Des études biochimiques ont révélé des associations entre certaines TAFs. TAF5 forme un sous-complexe stable avec TAF6 et TAF9 (Tao et al., 1997) et se lie aussi fortement à TAF1, TAF7 et TAF11 (Dubrovskaya et al., 1996). Comme TAF5 se lie à de nombreuses TAFs, il a été proposé que cette sous-unité soit à l'origine de la formation d'un complexe de TAFs. En outre, Taf3 ainsi que Taf8 et Spt7 hétérodimérisent avec Taf10

(Gangloff et al., 2001). Ainsi, il est très probable que les TAFs s'agencent en sous-complexes avant d'être incorporées aux complexes TFIID ou TFIIIC.

4.4.2.2 – Implication des TAFs dans la transcription

4.4.2.2.1 – *Les TAFs, médiateurs de l'activation de la transcription*

De nombreuses expériences réalisées *in vitro* ont montré que les TAFs sont capables **d'interagir avec des activateurs de la transcription** (de Jager et al., 2001a) et que cela contribue à renforcer la liaison de TFIID au promoteur (Abmayr et al., 1988 ; Workman et al., 1988), facilitant ainsi la formation du PIC (Albright and Tjian, 2000 ; Hoffmann et al., 1997). Par exemple, TAF9 interagit *in vitro* avec l'activateur acide viral VP16, et TAF10 avec le récepteur aux œstrogènes. Cependant, ces expériences ne permettent pas de savoir si les TAFs sont recrutées seules ou avec d'autres protéines pour former les complexes de type TFIID ou de type TFIIIC.

In vivo, la fonction des TAFs reste plus floue. Dans les cellules de mammifères, des expériences de transfection ont montré que TAF11 et TAF4 sont impliquées dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires (May et al., 1996a ; Mengus et al., 1997).

Les TAFs semblent également impliquées dans le **contrôle du cycle cellulaire**. Des mutations dans TAF2 provoquent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Martin et al., 1999). Des mutations dans TAF1 provoquent un arrêt du cycle en G1 (Sekiguchi et al., 1991). Les TAFs pourraient jouer des rôles différents tout au long du cycle cellulaire. Or la phosphorylation des TAFs et de TBP, dépendante du cycle cellulaire, pourrait inhiber sélectivement la capacité de TFIID à activer la transcription (Segil et al., 1996). Les TAFs sont très probablement impliquées dans la régulation de la transcription de gènes qui s'expriment en fonction du cycle cellulaire.

Chez la levure, la plupart des délétions des TAFs est létale (Poon et al., 1995; Reese et al., 1994), mais n'affecte pas forcément la réponse aux activateurs (Moqtaderi et al., 1996 ; Moqtaderi et al., 1998 ; Walker et al., 1996). Ces résultats ont permis de concevoir l'existence de deux groupes de promoteurs. Un premier groupe de **promoteurs dépendants des TAFs**, requiert la présence de TAFs pour initier correctement la transcription (Li et al., 2000), tandis qu'un deuxième groupe, nommé **indépendants des TAFs** ne lie pas les TAFs (ou en quantité faible par rapport à TBP) *in vivo* (expérience d'immunoprécipitation de la chromatine) (Kuras et al., 2000 ; Li et al., 2000). Les promoteurs dépendants ou indépendants des TAFs se distinguent également par leurs séquences activatrices localisées en amont du promoteur, qui ne permettent pas de recruter les TAFs dans le cas des promoteurs indépendants des TAFs (Li et al., 2002).

4.4.2.2.2 – *Mécanismes d'action proposés pour expliquer le rôle des TAFs dans l'activation de la transcription*

Diverses théories ont été proposées pour tenter d'expliquer le rôle des TAFs dans l'activation de la transcription.

Dans un premier temps, il a été suggéré que les TAFs jouent un rôle important dans la transcription *in vitro* de gènes dont les promoteurs sont **dépourvus de boîte TATA** (Martinez et al., 1994). TBP est capable, seule, de se substituer à l'ensemble du complexe TFIID *in vitro* dans un système basal de reconstitution de la transcription, excepté lorsque les promoteurs sont dépourvus de boîte TATA. Ainsi si les TAFs ne peuvent pas se lier à la boîte TATA, elles seront capables de contacter d'autres séquences d'ADN, comme l'initiateur ou bien les éléments en aval du promoteur. Ainsi les TAFs permettraient la transcription de gènes qui ne contiennent pas de boîte TATA dans leur promoteur.

Dans un deuxième temps, il a été suggéré que les TAFs soient impliquées dans l'**activation de la transcription de gènes inductibles**. Lorsque des levures sont soumises à un choc thermique, la proportion de complexe TFIID augmente par rapport à celle de TBP seule (Kuras et al., 2000).

Lorsque les TAFs interviennent dans la transcription de gènes inductibles et/ou de gènes dont le promoteur est dépourvu de boîte TATA, il est possible que ces TAFs s'associent en l'absence de TBP au sein d'un complexe multiprotéique différent de TFIID comme le complexe TFTC .

Dans un troisième temps, il a été proposé que les TAFs soient impliquées dans la **sélection de promoteurs à transcrire**. Des expériences de protection à la Dnase I avec des promoteurs distincts suggèrent que les TAFs se lient à différents promoteurs avec des affinités différentes.

Enfin, une théorie suppose que les TAFs provoquent un **changement de conformation du complexe ADN/TFIID** qui lui permettrait de passer de l'état inactif à l'état actif. Par exemple, la protéine TAF1 inhibe les interactions entre l'ADN et TBP puisqu'elle se lie au domaine de liaison à l'ADN de TBP (Liu et al., 1998). Ce modèle propose que TAF1 change de conformation suite à la liaison d'activateurs, libérant alors le domaine de liaison à l'ADN de TBP. TBP pourrait alors se fixer à l'ADN et l'initiation de la transcription démarrer.

Ainsi le complexe TFIID/ADN pourrait changer de conformation pour passer d'un état inactif en transcription à un état actif. Plusieurs états d'activité du complexe hTFIID pour les gènes de classe II (Hoffmann et al., 1997) ont été décrits :

1 – promoteurs ne contenant pas hTFIID, qui sont transcriptionnellement inactifs et qui ne peuvent pas être activés sans remodelage de la chromatine.

2 – « *poised genes* » où hTFIID est présent au niveau du promoteur à un stade inactif. Des stimulus peuvent alors rapidement rendre la transcription de ces gènes active.

3 – gènes activement transcrits contenant hTFIID.

Selon ce modèle, la présence de TBP au niveau de promoteurs n'est pas synonyme d'une transcription active. Certaines études *in vivo* d'immunoprécipitation de la chromatine vont dans ce sens puisqu'elles ont pu montrer qu'au niveau de certains promoteurs, TBP est lié à la boîte TATA avant l'intervention d'autres facteurs tels que les TAFs ou la polymérase II (Soutoglou and Talianidis, 2002). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et de fluorescence ont même montré que TBP peut s'associer à la chromatine très condensée en mitose (Christova and Oelgeschlager, 2002). TBP serait présente au niveau de promoteurs avant même que la transcription ne débute, et servirait ainsi de repère pour la

réinitiation de la transcription (Davidson, 2003). D'autres études *in vitro* ont aussi proposé que les TAFs soient impliqués dans la **réinitiation de la transcription** (Oelgeschlager et al., 1998).

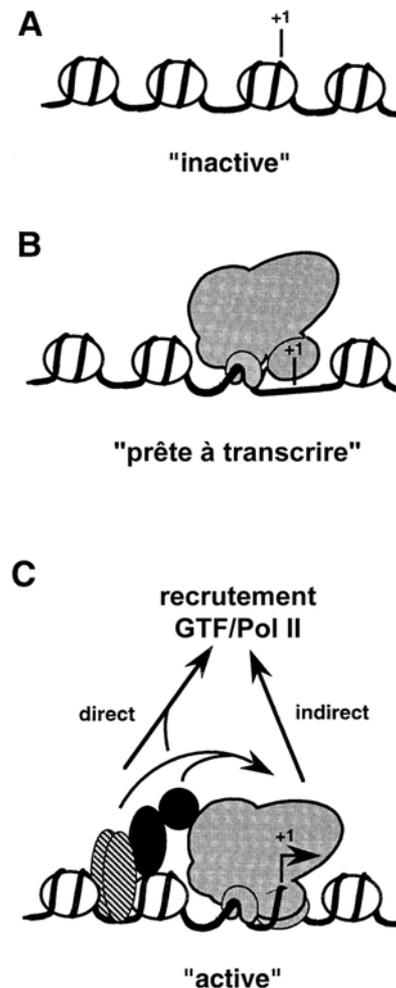


Figure 23 : Différents stades de l'expression des gènes, d'après (Hoffmann et al., 1997)

A - Les gènes inactifs sont retrouvés au niveau de la chromatine compactée et sont inaccessibles aux facteurs de transcription. Dans ce modèle, l'assemblage du PIC ainsi que l'initiation de la transcription est précédé par l'action de facteurs capables de remodeler la chromatine.

B - TFIID est fixé au niveau du promoteur de gènes « prêts à être transcrits ». L'expression de ces gènes n'est pas active, mais rapidement inductible. La conformation de ce complexe en l'absence de stimuli rend impossible le recrutement de l'ARN polymérase II ainsi que des facteurs généraux de transcription.

C - gènes activement transcrits par la liaison d'activateurs au niveau de séquences spécifiques, ce qui permet le recrutement, direct ou indirect, de la machinerie de transcription.

4.4.2.2.3 – Modifications de la structure de la chromatine par les TAFs

Outre leur rôle de pont moléculaire entre les activateurs et la machinerie transcriptionnelle de base, on pense que les TAFs participent aux modifications de la structure de la chromatine pour activer la transcription de certains gènes.

D'emblée, si la structure des TAFs peut **mimer celle des nucléosomes**, il est facile d'imaginer que TFIID modifie la structure de la chromatine en s'incorporant à la structure « en collier de perle ». Or, remplacer les histones par des TAFs peut induire des modifications chimiques locales conduisant à un contexte plus favorable à l'initiation de la transcription.

D'autre part, la sous-unité **TAF1** est douée **d'une activité HAT**, qui est associée aux régions particulièrement actives au niveau de la transcription (Mizzen et al., 1996). **TAF1** est également douée d'une activité enzymatique de type **kinase** qui peut être reliée à l'activation de la transcription. En effet, des études chez la *Drosophile* ont montré que TAF1 peut phosphoryler la sérine 33 de l'histone H2B. Or cette modification se retrouve dans la chromatine active en transcription et dans la chromatine au stade de la mitose, ce qui laisse à penser que l'activité kinase de TAF1 est impliquée dans l'activation de la transcription (Maile et al., 2004).

Enfin, **TAF1** est douée d'une troisième activité enzymatique, de **mono-ubiquitination**, ciblant *in vivo* et *in vitro*, **l'histone H1** (Pham and Sauer, 2000). Cette modification sur les histones H2A et H2B est enrichie au niveau des régions de la chromatine active. L'ubiquitination constitue une première marque pour la dégradation des protéines via le protéasome. Si les histones H1 sont dégradées, il est probable que cela permette la décondensation de la structure de la chromatine.

Ainsi les activités enzymatiques associées à TAF1 peuvent contribuer à modifier la structure de la chromatine, la rendant plus accessible aux facteurs d'initiation de la transcription.

En résumé, on pense que l'action des TAFs passe par le recrutement de la machinerie de base *via* les activateurs, ou par la modification de la structure de la chromatine. Mais comme nous l'avons vu, *in vivo*, les fonctions de ces protéines restent méconnues. En fait, la contribution des TAFs comme coactivateurs transcriptionnels semble varier d'un promoteur à l'autre, reflétant en cela la complémentarité ou la redondance des activités coactivatrices présentes dans un extrait nucléaire. Les TAFs ne sont pas toujours nécessaires au processus d'activation de la transcription, et pourraient être remplacées par d'autres coactivateurs tels que certaines sous-unités du Médiateur. Dans d'autres cas, les TAFs et les sous-unités du Médiateur sont nécessaires pour activer la transcription (Guermah et al., 2001).

Quoiqu'il en soit, nous ne connaissons toujours pas toutes les fonctions de ces protéines. Leurs rôles de coactivateurs a été beaucoup étudié, mais lors d'expériences de transcription *in vitro*, TBP seule s'avère parfois plus efficace en transcription qu'associée aux TAFs. Cette différence pourrait s'expliquer par un effet corépresseur des TAFs (Guermah et al., 2001). De plus, certaines études ont montré que la présence des TAFs peut être utile lors de la répression de la transcription de certains gènes (Fondell et al., 1996a ; Hou et al., 2000).

4.4.3 – Variabilité du complexe TFIID

La diversité des complexes TFIID peut être à l'origine de la régulation très fine de l'expression des gènes. En effet, la composition des sous-unités du complexe TFIID peut

varier en fonction du stade de différenciation de la cellule, ainsi que du tissu dans lequel elle se trouve.

Par exemple, la sous-unité TAF6 peut exister sous plusieurs isoformes α , β , γ , δ , et l'expression de l'isoforme δ est augmentée dans les cellules, suite à des **stimuli apoptotiques**, ce qui suggère que le complexe TFIID contenant cette sous-unité soit impliqué dans l'apoptose (Bell et al., 2001).

Par ailleurs, des homologues de TAFs s'expriment dans des tissus particuliers. Par exemple, TAF4b est un TAF spécifiquement retrouvé dans le tissu ovarien, et son absence provoque une inhibition de la formation des follicules ovariens (Freiman et al., 2002). Il est intéressant de remarquer que les sous-unités du complexe TFIID semblent différer lors de la **spermatogénèse** :

- TAF7L, un paralogue de TAF7
- TAF1L, un paralogue de TAF1 (Pointud et al., 2003; Wang and Page, 2002).

Ces études révèlent un lien entre un agencement de sous-unités de TFIID déterminé et une fonction physiologique. La multiplicité des complexes peut donc jouer un rôle majeur dans la régulation de la transcription de gènes en fonction du tissu et du stade de différenciation des cellules.

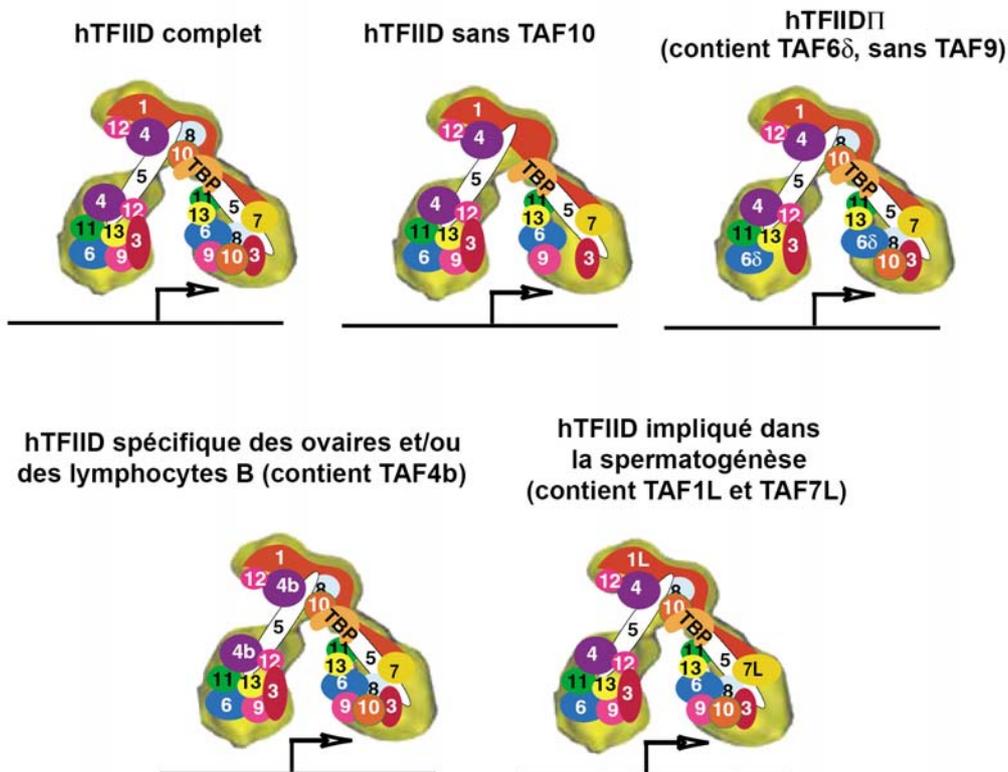


Figure 24 : Représentation schématique de divers complexes TFIID, d'après (Muller and Tora, 2003)

Des complexes TFIID spécifiques sont retrouvés dans des tissus particuliers ainsi que dans des processus cellulaires déterminés. La flèche représente l'élément initiateur au niveau du promoteur.

4.4.4 – Les TAFs sans TBP

Les TAFs sont détectées au sein de complexes multiprotéiques distincts de TFIID, tels que SAGA, STAGA, et TFTC, exempts de la protéine TBP, ce qui indique que ces protéines peuvent agir indépendamment du complexe TFIID. Des études d'expression de gènes à grande échelle chez la levure ont montré que les TAFs partagées par SAGA et TFIID sont impliquées dans la transcription d'un plus grand nombre de gènes que les sous-unités spécifiques à chaque complexe (Lee et al., 2000).

4.5 – Les complexes SAGA, TFTC/STAGA /PCAF

4.5.1 – Le complexe de levure SAGA

4.5.1.1 – Composition et études structurales du complexe SAGA

Le complexe SAGA, isolé chez la levure, est le mieux caractérisé des complexes SAGA/TFTC/STAGA/PCAF. C'est un large complexe de 1,8 MD composé d'une quinzaine de sous-unités qui réunit divers groupes de protéines : les adaptateurs de transcription (Ada1, Ada2, Ada3, Ada5, et Gcn5), des protéines Spt (Spt3, Spt7, Spt8 et Spt20), une partie des TAFs (TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 et TAF12), la protéine Tra1 homologue de la protéine hTRRAP humaine. En plus de ces sous-unités, de nouvelles sous-unités ont été identifiées : Ubp8, une protéase spécifique de la dé-ubiquitination de H2B, Sgf11 requis pour l'incorporation de Ubp8 dans les complexes (Ingvarsdottir et al., 2005), Sgf29 et Sgf73, dont les fonctions sont inconnues, et la protéine Sus1 qui fait aussi partie de la machinerie d'export nucléaire de l'ARNm.

La **structure du complexe SAGA** a été résolue à 30 Å par microscopie électronique et l'emplacement des sous-unités, déterminé par immunolocalisation, a permis d'attribuer des fonctions spécifiques à chaque domaine du complexe SAGA (Figure 25)(Wu et al., 2004). Un modèle a été proposé dans lequel 5 domaines sont décrits. Le domaine 1, qui contient la protéine Tra1, l'homologue de hTRRAP, peut servir d'interface avec les activateurs. Les domaines II, III et IV, au centre de la structure, contiennent principalement des TAFs (le domaine II contient TAF5 et TAF6, le domaine III TAF10, TAF5 Gcn5, Spt7 et Ada1, et le domaine IV Ada1 et TAF6). On remarque que le domaine III contient les sous-unités Gcn5 et Spt7, il n'est donc pas uniquement un domaine structural important, mais aussi fonctionnel puisqu'il est doué d'activité HAT. Enfin, le dernier domaine, dont la structure semble plus flexible se compose des sous-unités Spt3, Spt20 et probablement Spt8, délimite un module capable d'interagir avec la protéine TBP.

L'analyse de **mutants de sous-unités du complexe SAGA** avait déjà montré qu'il est possible de classer les protéines Ada et Spt en plusieurs catégories selon leur rôle structural et fonctionnel. Des mutations à l'intérieur des gènes codant pour **Ada1, Spt7 ou Spt20/Ada5**, ont conduit à la destruction des complexes SAGA et à l'inhibition de la croissance cellulaire, ce qui accorde un rôle crucial à ces sous-unités dans la structure et la fonction du complexe SAGA. Deux de ces sous-unités, Spt7 et Ada1, ont été immunolocalisées en microscopie électronique au niveau du domaine III, soit au centre de la

structure. Il paraît donc logique que leur délétion déstabilise complètement la formation du complexe SAGA.

Lorsque d'autres sous-unités comme Ada2/Ada3/Gcn5 ou Spt3/Spt8 sont mutées, le complexe garde son intégrité et les phénotypes observés sont très discrets (Sterner et al., 1999), ce qui suggère que ces sous-unités jouent des rôles annexes.

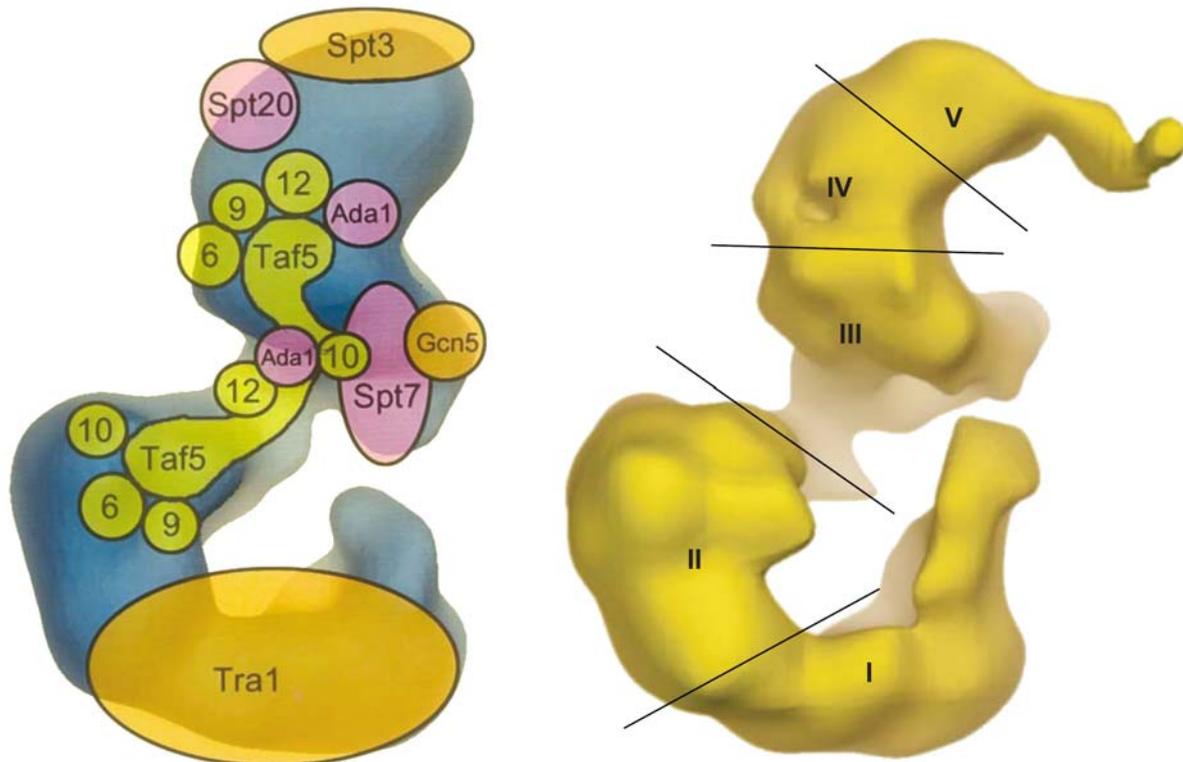


Figure 25 : Structure du complexe SAGA résolue par microscopie électronique, d'après (Timmers and Tora, 2005; Wu et al., 2004).

A – Représentation schématique de la localisation des sous-unités du complexe SAGA sur la structure 3D. Les Taf5 sont représentées en jaune. L'extension de Taf5, ainsi que la localisation de Taf9 et de Taf12 ont été déduites de précédentes immunolocalisations au niveau de TFIID (Leurent et al., 2004 ; Leurent et al., 2002). Les sous-unités importantes pour l'architecture du complexe, ainsi que celles comportant un domaine de repliement de type « histone fold » sont représentées en violet, tandis que les sous-unités impliquées à différents niveaux de la transcription sont représentées en orange.

B – Structure tridimensionnelle du complexe SAGA avec un module flexible. La taille de ce complexe est de 18 x 28 nm et comprend cinq domaines. Les cinq domaines contiennent différentes sous-unités de SAGA et sont séparés artificiellement par des barres.

4.5.1.2 – SAGA, coactivateur transcriptionnel

In vivo et *in vitro*, les composants du complexe SAGA sont essentiels au bon déroulement de la transcription de certains gènes. *In vitro*, le complexe SAGA purifié est capable d'activer la transcription dans un contexte chromatinien, grâce d'une part à son activité HAT et d'autre part à sa capacité à se lier aux activateurs acides tels que VP16 ou Gcn4 (Bhaumik et al., 2004; Qiu et al., 2005 ; Utley et al., 1998).

In vivo, l'examen de mutants des sous-unités du complexe SAGA a permis d'identifier des gènes dont la transcription est activée par le complexe SAGA, comme *Gal1*, *Trp3*, *His3* (Larschan and Winston, 2001).

D'autres approches *in vivo* ont été utilisées pour étudier la liaison des sous-unités du complexe SAGA au niveau de certains promoteurs.

Des études d'**immunoprécipitation de la chromatine** (ChIP) ont montré que le domaine d'activation Gal4 recrute SAGA au niveau d'une séquence activatrice en amont (UAS) du promoteur du gène *Gal1*. Les effets de l'activateur Gal4, comme le recrutement de SAGA ou la stimulation de l'assemblage du PIC, sont dépendants d'une partie des sous-unités du complexe SAGA. Ces études ont permis d'élaborer un modèle d'activation de la transcription par Gal4 (Figure 26) dans lequel Gal4 se fixe d'abord à la séquence UAS, puis recrute le complexe SAGA, qui à son tour recrute TBP au niveau de la boîte TATA, ce qui permet alors l'arrivée des facteurs généraux de la transcription (Bhaumik and Green, 2001).

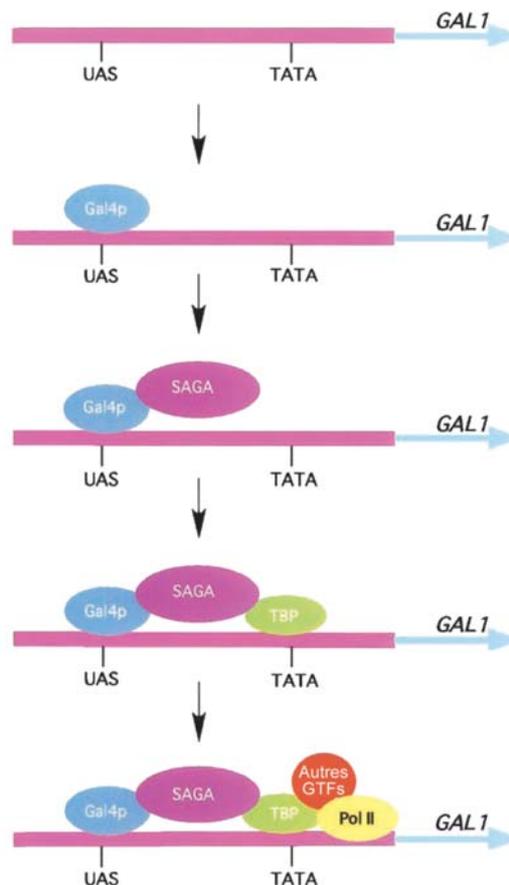


Figure 26 : SAGA, coactivateur transcriptionnel. Résumé de l'assemblage des complexes multiprotéiques au niveau du promoteur *GAL1*, d'après (Bhaumik and Green, 2001)

Les études cinétiques n'ont pas permis de déterminer l'ordre de recrutement entre SAGA et TBP. Toutefois, le résultat d'études de mutations indiquent que SAGA est capable de se fixer au niveau de ce promoteur en l'absence de TBP. Dans ce modèle, le recrutement des GTFs est représenté après celui de TBP, mais il est possible que certaines GTFs se fixent conjointement à TBP.

D'autres études *in vivo* par **FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) ont montré une interaction directe entre l'activateur acide Gal4 et Tra1, la plus grande sous-unité du complexe SAGA (Bhaumik et al., 2004).

Pour l'étude de l'implication des complexes dans la transcription *in vivo*, ces méthodes sont très prometteuses. Chez la levure, elles sont facilitées par l'obtention plus aisée de mutants et de grandes quantités de chromatine pour la réalisation des ChIP.

Pour le génome entier de levure, SAGA est impliqué dans la transcription de **10 % des gènes** qui correspondent à **des gènes inductibles après stress** (Huisinga and Pugh, 2004). Au niveau de ces promoteurs, SAGA est nécessaire au recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base, ainsi qu'au recrutement probable de la protéine TBP (ces promoteurs sont pourvus d'une boîte TATA)(Bhaumik and Green, 2002 ; Huisinga and Pugh, 2004; Larschan and Winston, 2001). SAGA, contrairement à TFIID ne se fixe pas au cœur du promoteur, mais via des séquences activatrices en amont (UAS) (Bhaumik and Green, 2001; Larschan and Winston, 2001), en accord avec son implication dans la transcription de gènes inductibles. Quoiqu'il en soit, SAGA semble participer à l'assemblage du PIC, comme TFIID, et s'impose alors comme facteur essentiel pour initier la transcription de certains gènes.

La question s'est posée de savoir si SAGA et TFIID interviennent ensemble ou séparément pour initier la transcription. Tandis que la transcription de 70% des gènes est dépendante des sous-unités partagées par TFIID et SAGA, la transcription de seulement 12% des gènes est affectée par l'absence des sous-unités spécifiques de SAGA, et 30% par l'absence de sous-unités spécifiques de TFIID (Lee et al., 2000).

4.5.1.3 – Le complexe SAGA, doué d'activité HAT

SAGA participe également à l'activation de la transcription en facilitant l'accessibilité à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle de base grâce à sa protéine Gcn5 capable d'acétyler les histones. L'intégration de Gcn5 dans le complexe SAGA lui confère une spécificité de substrat toute particulière. Gcn5 dans SAGA peut **reconnaître les histones agencées en nucléosomes**, s'y fixer et acétyler préférentiellement l'histone H3 mais aussi l'histone H2B. La reconnaissance du substrat nucléosomal implique le bromodomaine de la protéine Gcn5. Or, ce domaine s'associe avec les protéines Ada, ce qui souligne l'importance des autres sous-unités du complexe SAGA dans la reconnaissance des nucléosomes. De plus, le profil d'acétylation de la protéine Gcn5 intégrée à SAGA est plus étendu : en plus de la lysine 14, d'autres résidus lysines sont acétylés à l'extrémité N-terminale de l'histone H3. La fonction de la protéine Gcn5 est ainsi modifiée en fonction des protéines qui lui sont liées.

Un autre complexe de 800 Kda, ADA, partage quelques protéines avec le complexe SAGA, comme Gcn5, Ada2 et Ada3, et possède la même capacité d'acétyler les histones agencées en nucléosomes. Toutefois, la spécificité d'acétylation est quelque peu différente, puisque le complexe ADA acétyle uniquement les résidus 14 et 18 sur l'histone H3, tandis que SAGA acétyle les résidus 9, 14, 18 et 23 (Eberharter et al., 1999 ; Grant et al., 1998a). Ce complexe n'est pas simplement un module de SAGA, car il possède une sous-unité spécifique nommée Ahc1 (pour *ADA HAT complex component 1*) impliquée dans l'intégrité

structurale du complexe. Néanmoins, les fonctions spécifiques de ce complexe sont encore mal connues (Eberharter et al., 1999).

4.5.1.4 – Présentation de quelques sous-unités du complexe SAGA

Le complexe SAGA est composé d'un ensemble de **TAFs** important pour la fonction d'activation de la transcription et d'acétylation *in vitro*. Le rôle exact des TAFs au sein du complexe SAGA n'est pas encore connu. Il est probable que ces protéines jouent un rôle architectural majeur au sein du complexe, puisqu'elles sont localisées à des positions clés, formant le squelette du complexe. On peut ainsi imaginer que l'importance fonctionnelle des TAFs découle de leur rôle structural, que ces protéines permettent d'intégrer les autres sous-unités pour rendre le complexe fonctionnel. Les TAFs peuvent également avoir des fonctions plus spécifiques, comme participer à l'interaction avec TBP ou être impliquées dans le déplacement des histones, mais ces hypothèses restent à démontrer.

La protéine **Tra1** joue un rôle structural de premier ordre dans l'édifice du complexe SAGA et interagit avec des activateurs acides tels que VP16, ce qui lui confère un rôle de coactivateur transcriptionnel (Bhaumik et al., 2004 ; Qiu et al., 2005).

Quelques fonctions ont été attribuées à des sous-unités du complexe SAGA, mais on ne connaît toujours pas le rôle précis de ces sous-unités en son sein : pourquoi ces protéines sont-elles groupées d'une manière aussi stable?

4.5.1.5 – Modularité des complexes SAGA

Des travaux plus récents ont montré que la composition de ce complexe est dynamique et ses fonctions variées, et toutes deux dépendent des différentes conditions dans lesquelles la cellule se trouve. Les complexes SAGA « classiques » sont formés lorsque les levures sont dans un milieu riche, qui réprime la transcription de *His3*, tandis qu'en plaçant dans des conditions où *His3* est transcrit, un complexe SAGA altéré est formé (dépourvue de protéine Spt8) (Belotserkovskaya et al., 2000). Ces résultats vont dans le sens d'autres études qui ont montré qu'un variant du complexe SAGA, appelé **SALSA** ou **SLIK** (sans Spt8 et avec une forme tronquée de la protéine Spt7) constitue la forme fonctionnelle pour activer la transcription chez la levure (Sternier et al., 2002a). Ces résultats ont permis de construire un modèle d'activation de la transcription des complexes multiprotéiques de type SAGA, dans lequel une forme spécifique du complexe serait prédominante pour activer la transcription au niveau de certains promoteurs, alors que l'autre forme n'est visualisée que lorsque les gènes ne sont pas transcrits. Il reste à comprendre comment les complexes modifient leur composition pour passer d'une forme inactive à une forme active en transcription.

Le complexe SAGA, sous diverses formes, semble réguler la transcription d'ensemble de gènes différents (Pray-Grant et al., 2002). Ainsi les complexes SAGA et **SLIK** (SALSA) ont en commun certaines activités, alors que d'autres leur sont spécifiques et restent à clarifier (Wu and Winston, 2002). Quoiqu'il en soit, la différence de composition protéique entre les complexes SAGA et SLIK constitue la base de différences fonctionnelles

importantes entre les deux complexes. En effet, la sous-unité Spt8, présente dans le complexe SAGA et non dans SLIK, joue un rôle important dans l'interaction entre SAGA et TBP. *In vitro*, les mutants *spt8Δ* sont incapables d'interagir avec TBP (Saleh et al., 1997). La protéine Spt3, impliquée elle aussi dans l'interaction avec TBP, est requise pour la formation du complexe de préinitiation au niveau du promoteur *GALI* (Bhaumik and Green, 2001 ; Dudley et al., 1999). On est surpris de constater que les interactions Spt3-TBP ou Spt8-TBP inhibent la transcription au niveau de certains promoteurs (Warfield et al., 2004). L'interaction entre Spt8 et TBP est soit nécessaire à l'initiation de la transcription au niveau de certains promoteurs, soit elle inhibe la transcription au niveau d'autres promoteurs. Cette « double » fonction de Spt8 confère une spécificité fonctionnelle au complexe SAGA, mais pas au complexe SLIK, qui en est dépourvu.

En résumé, d'après le modèle construit à partir de la structure tridimensionnelle de SAGA (microscopie électronique), certaines sous-unités du complexe SAGA, plus mobiles, peuvent modifier la composition de ce complexe. Ainsi, grâce à ce vaste réseau d'interactions entre protéines, toujours dynamique, il est probable que ce complexe soit impliqué dans des activités assez variées.

4.5.1.6 – Action concertée des complexes SAGA/ complexe Médiateur et SAGA/Swi/Snf

Le complexe SAGA s'agence à d'autres complexes de protéines dans le but d'activer la transcription, tels que le complexe Médiateur et les complexes Swi-Snf.

Les sous-unités du complexe Médiateur de levure MED12-CycC jouent un rôle dans l'activation de la transcription du gène *Gall* comme SAGA. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine suggèrent que MED12-CycC ne s'associent au promoteur du gène *Gall* qu'en présence du complexe SAGA. De même, les liaisons de TBP et MED12-CycC au niveau du promoteur *gall* sont interdépendantes (Larschan and Winston, 2005). D'autres études plus globales vont dans ce sens, car elles ont montré que la majorité des promoteurs régulés par SAGA requiert également la présence du complexe Médiateur (Basehoar et al., 2004 ; Huisinga and Pugh, 2004 ; Qiu et al., 2005).

SAGA et le complexe Swi/Snf (impliqué dans le remodelage de la chromatine) interagissent ensemble et participent à l'activation de la transcription de manière complémentaire ou partiellement redondante (Topalidou et al., 2004).

Ces expériences soulignent l'importance de recruter plusieurs complexes de protéines au niveau de certains promoteurs pour activer la transcription, notamment par l'altération de la structure chromatinienne.

4.5.2 – Le complexe PCAF

Le complexe PCAF comprend une protéine douée d'activité HAT nommée PCAF (« *p300/CBP Associated Factor* ») et partage de nombreuses sous-unités protéiques avec les complexes GCN5, STAGA et TFTC.

La protéine p300/CBP, qui interagit avec la protéine PCAF, n'est pas présente en quantité stoechiométrique dans le complexe PCAF purifié, ce qui indiquerait que l'interaction ne peut s'établir qu'au niveau de certains promoteurs.

Ce complexe a été isolé grâce à l'expression de PCAF portant un épitope Flag dans des cellules de type HeLa, ce qui a permis l'identification d'une vingtaine de sous-unités, dont 11 sont homologues au complexe de levure SAGA. Ce complexe comprend par exemple les sous-unités hADA2, hADA3, SPT3, hTRRAP, TAF9, TAF10, TAF12, TAF6L et TAF5L (Vassilev et al., 1998), homologues de sous-unités de SAGA.

Par contre, certaines sous-unités du complexe SAGA sont absentes du complexe PCAF, comme la protéine TAF5, ce qui est particulièrement surprenant puisque TAF5 est localisée dans une région cruciale pour l'intégrité de l'architecture du complexe SAGA chez la levure (Wu et al., 2004). Si l'absence de TAF5 dans le complexe PCAF semblait assez surprenante au premier abord, ce complexe comprend pourtant également les protéines TAF5L et TAF6L, très similaires aux protéines TAF5 et TAF6 respectivement. Il a été proposé que ces protéines puissent remplacer les TAFs pour former une structure ressemblant à celle des nucléosomes (Schiltz and Nakatani, 2000).

De nombreuses similarités sont observées entre les complexes PCAF et les complexes qui contiennent la protéine GCN5, tels que STAGA et TFTC, mais leurs sous-unités ne sont pas toutes identiques. Nous savons que les protéines PCAF et GCN5 s'expriment dans des tissus spécifiques chez la souris. Il est envisageable que ces complexes multiprotéiques diffèrent au niveau de leur composition ou de leur activité en fonction des tissus ou bien du stade de développement cellulaire.

4.5.3 – Le complexe STAGA (SPT3-TAF(II)31-GCN5L acetylase)

4.5.3.1 – Composition du complexe STAGA

C'est un homologue du complexe SAGA chez la levure. Il contient l'HAT GCN5, un certain nombre de TAFs (TAF10, TAF12, TAF9), SPT7, SPT3, ADA1, ADA3, SAP 130, TAF5L et TAF6L. A la différence du complexe TFTC isolé au laboratoire, ce complexe ne semble pas contenir de TAFs de haut poids moléculaire telles que TAF5 ou bien TAF6. Or, l'immunolocalisation de TAF5 dans SAGA attribue une place centrale à TAF5 dans l'architecture du complexe, ce qui laisse penser que sans cette protéine, le complexe est détruit (Wu et al., 2004). Le complexe STAGA contient les protéines TAF5L et TAF6L (PAF65 β et PAF65 α , respectivement) qui, homologues des TAF5 et 6, peuvent les remplacer (Martinez et al., 2001). La composition des complexes TFTC et STAGA est donc très proche et il devient difficile de les distinguer. Plusieurs groupes ont nommé l'ensemble de ces complexes « TFTC-like ».

4.5.3.2 – Fonctions du complexe STAGA

Il existe peu de données fonctionnelles pour ce complexe. Sans surprise, STAGA s'avère doué d'**activité HAT** ciblée principalement sur l'histone H3, tout comme GCN5. Des tests d'acétylation *in vitro*, sur des histones libres ou agencées en nucléosomes, ont en effet révélé la capacité de STAGA à acétyler l'histone H3 (Martinez et al., 2001).

La capacité d'activer la transcription *in vitro* a été testée par la suite. Premièrement, **STAGA** se fixe sur l'activateur **VP16** *in vitro* (chromatographie d'affinité GST-VP16). Comme nous le verrons dans la partie II résultats, TFTC peut également se fixer à GST-VP16. Ensuite, des expériences d'activation de la transcription ont été réalisées avec VP16 et elles montrent l'incapacité de STAGA à activer la transcription sur une matrice d'ADN nue. Par contre, lorsque l'expérience est réalisée avec un substrat d'ADN chromatinien, STAGA facilite l'activation de la transcription par VP16. Ces résultats concordent avec la fonction d'acétylation des histones H3, dont on présume qu'elle facilite la transcription uniquement dans un contexte chromatinien (Martinez et al., 2001).

STAGA est par ailleurs impliqué dans **l'activation de la transcription par c-myc**. Des expériences d'interaction *in vitro* (immunoprécipitation et chromatographie d'affinité GST-Myc) révèlent une interaction stable entre c-myc et les sous-unités du complexe STAGA. Grâce à des expériences de transfection transitoires, les auteurs ont montré que TRRAP et GCN5 sont tous deux requis pour l'activation de la transcription par c-myc (Liu et al., 2003b).

Ainsi le complexe STAGA joue un rôle dans la transcription en tant que **coactivateur**.

D'autre part, ce complexe est impliqué dans la **réparation de l'ADN par excision de nucléotides**. Il peut lier différentes protéines impliquées dans l'épissage alternatif et dans la réparation par excision de nucléotides (Martinez et al., 2001).

Certaines des fonctions du complexe STAGA sont communes au complexe TFTC, comme l'activation de la transcription par VP16, ou bien l'implication dans la réparation des cassures d'ADN.

4.5.4 – Le complexe TFTC

4.5.4.1 – Caractérisation biochimique et structurale

Lors d'une purification du complexe TFIID dans notre laboratoire, une fraction sans la protéine TBP a été identifiée. Elle contenait encore des TAFs associées à d'autres facteurs. Après caractérisations biochimiques et structurales, il s'est avéré que cette fraction contenait un nouveau complexe multiprotéique stable appelé **TFTC** pour « *TBP Free TAF Containing Complex* ».

La purification de TFTC s'articule en plusieurs parties. Tout d'abord, des extraits de cellules HeLa sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps contre TAF10 ; le matériel élué est ensuite immunoprécipité à l'aide d'un anticorps contre TBP ; ainsi l'éluat de deuxième immunoprécipitation contient le complexe TFIID. Le surnageant de cette deuxième IP est par la suite immunodéplété en TBP, et cette fraction contient le complexe TFTC (Wieczorek et al., 1998).

Toutes les études fonctionnelles et structurales du complexe TFIC avant mon arrivée au laboratoire ont été réalisées avec ce surnageant de deuxième IP.

4.5.4.1.1 – La composition en protéines

Ce complexe partage certaines sous-unités avec le complexe TFIID, comme TAF2, TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF9, TAF10 et TAF12. Par contre, certaines TAFs sont présentes spécifiquement dans TFIID, TAF1 et TAF11. D'une manière logique, les TAFs présentes uniquement dans TFIID interagissent avec TBP. TFIC comprend des sous-unités spécifiques, comme hTRRAP, l'HAT GCN5, ADA1, ADA3, SPT3, SPT7-like, SAP130, TAF5L et TAF6L qui sont retrouvées dans le complexe STAGA et constituent des homologues de sous-unités du complexe SAGA chez la levure. Ma thèse discute de l'identification d'une nouvelle sous-unité du complexe TFIC, **la protéine ataxin 7** (partie IV résultats).

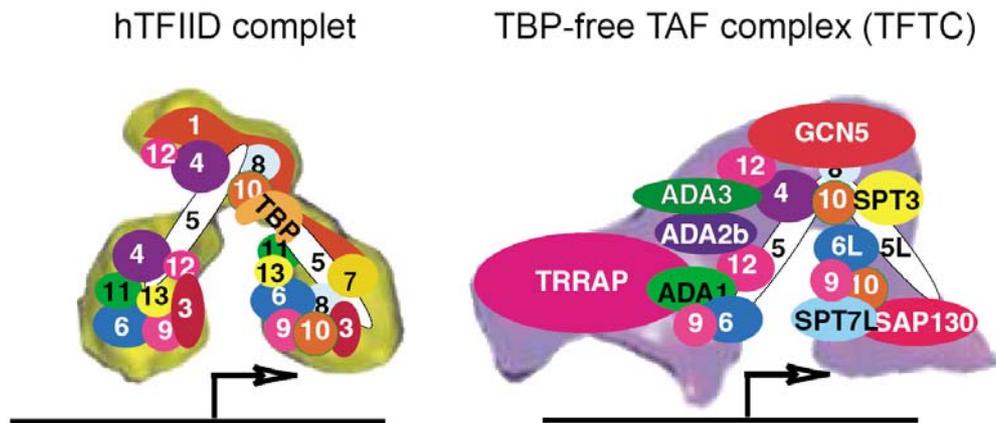


Figure 27 : représentation schématique des complexes TFIID et TFIC, d'après (Muller and Tora, 2003). L'emplacement des différentes sous-unités en fonction des données structurales est respectée. La protéine ataxine 7 n'est pas représentée dans TFIC ; sa localisation n'est pas encore déterminée.

4.5.4.1.2 – La structure du complexe TFIC

La structure du complexe multiprotéique TFIC a été résolue par microscopie électronique au laboratoire, en collaboration avec le laboratoire du Dr Schultz (Brand et al., 1999a). Le complexe présente une structure plus allongée que le complexe TFIID, et une partie de la structure se superpose à celle du complexe TFIID (Figure 28). Le complexe ressemble à une pince macromoléculaire composée de cinq domaines globulaires arrangés autour d'un sillon d'une taille pouvant contenir l'ADN. La structure du complexe SAGA, homologue de TFIC, a depuis été résolue et certaines sous-unités, immunolocalisées. Par analogie, il est possible d'imaginer maintenant la localisation de certaines protéines dans TFIC (voir structure du complexe SAGA, chapitre 4.5.1). La résolution de la structure du complexe TFIC confirme visuellement l'existence de ce complexe.

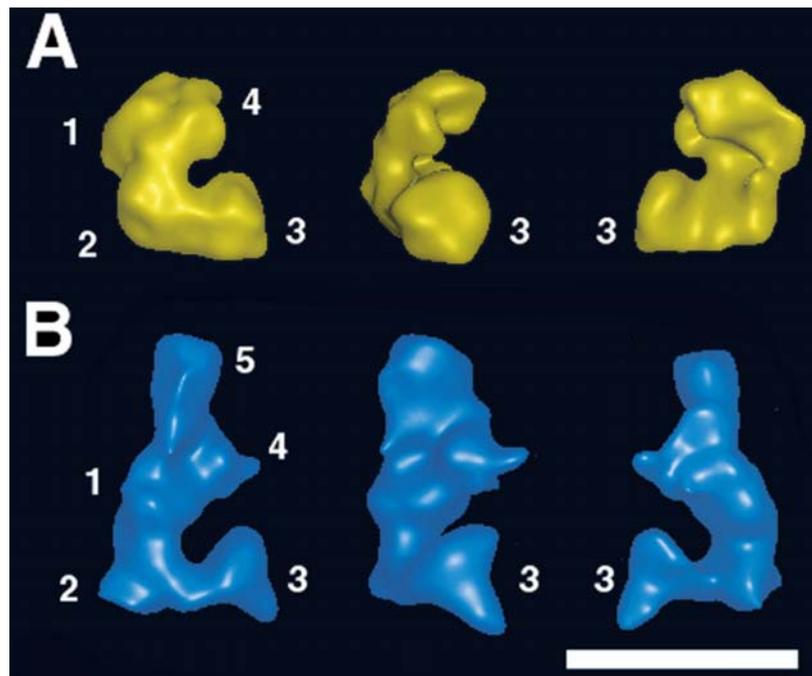


Figure 28 : TFTC et TFIID, structures tridimensionnelles des complexes TFIID en haut (A) et TFTC en bas (B), résolues par microscopie électronique, d'après (Brand et al., 1999a)

Les trois orientations correspondent à une rotation d'un angle de 80° autour d'un axe vertical. Les domaines sont numérotés de 1 à 4 pour TFIID et de un à cinq pour TFTC. A – 115 vues différentes ont été utilisées pour construire le modèle 3D de TFIID. B- Un total de 112 vues de TFTC ont été utilisées pour construire ce modèle tridimensionnel.

La barre blanche représente 20 nm.

4.5.4.2 – Etudes fonctionnelles

4.5.4.2.1 – *Test de transcription in vitro*

Des expériences de transcription menées au laboratoire ont montré que TFTC joue un rôle dans l'initiation de la transcription, de la même manière que TFIID, avec divers types de promoteurs, pourvus ou dépourvus de boîte TATA.

Le rôle de TFTC dans l'activation de la transcription a alors été examiné. Après inactivation des extraits nucléaires par chauffage, TFTC est capable d'activer la transcription par VP16 sur une matrice d'ADN nue, tout comme TFIID (Wieczorek et al., 1998).

Suite à la mise en évidence d'une implication de TFTC dans l'initiation de la transcription, il a été suggéré que le complexe TFTC puisse se fixer au promoteur comme TFIID. Des expériences de protection à la DNaseI ont alors montré que TFTC peut reconnaître des séquences de l'élément initiateur du promoteur AdMLP. Les TAFs peuvent jouer un rôle important dans la liaison de TFTC au niveau de l'élément initiateur, puisqu'elles peuvent également se fixer au niveau de cette région (Wieczorek et al., 1998).

4.5.4.2.2 – Test HAT

Le complexe TFTC, qui comprend la protéine GCN5 douée d'activité HAT, est capable d'acétyler *in vitro* les histones libres H3 et H1 (Brand et al., 1999b).

Chez la levure, la protéine recombinante Gcn5 acétyle très bien les histones libres, mais pas celles agencées en nucléosomes. L'activité HAT de Gcn5 semble modulée par les protéines qui lui sont liées. En effet, lorsque la protéine native Gcn5 est intégrée à des complexes du type SAGA, elle devient capable d'acétyler les nucléosomes *in vitro* (Grant et al., 1997). De même, l'ensemble du complexe TFTC est également requis pour acétyler l'histone H3 agencé en nucléosomes (Brand et al., 1999b). Ainsi la protéine GCN5 a besoin d'autres facteurs pour pouvoir acétyler les histones agencés en nucléosomes.

4.5.4.2.3 – TFTC, coactivateur de la transcription

In vitro, TFTC est capable d'activer la transcription par VP16 sur une matrice d'ADN nue (Wieczorek et al., 1998).

TFTC semble également impliqué dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires en présence de leurs ligands. *In vivo*, certaines sous-unités du complexe TFTC se lient au récepteur aux œstrogènes ER α uniquement en présence de ligand (E2). Des expériences de transfection ont ensuite souligné l'importance de la présence des sous-unités hTRRAP et GCN5 pour activer la transcription par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires (Yanagisawa et al., 2002). Ces études montrent une implication probable des complexes de type TFTC dans l'activation de la transcription par les œstrogènes. Le système d'activation de la transcription par les œstrogènes a été utilisé lors de cette thèse pour étudier la dynamique de liaison de certaines sous-unités de TFTC au niveau de promoteurs endogènes tels que ceux de la cathepsine D ou de pS2 (voir partie II Résultats, immunoprécipitation de la chromatine).

4.5.4.2.4 – TFTC impliqué dans la réparation par excision de nucléotides

Le complexe TFTC contient une sous-unité de 130 Kda, SAP130 (*spliceosome-associated protein 130*) fortement homologue à la protéine DDB1, qui est recrutée au niveau de lésions d'ADN induites par les UV *in vivo* (Brand et al., 2001; Green and Almouzni, 2003). *In vitro*, le complexe TFTC se fixe préférentiellement au niveau de l'ADN soumis aux UV et n'est alors plus disponible pour activer la transcription. Ainsi, le complexe TFTC, en plus de son rôle dans l'initiation de la transcription, pourrait être impliqué dans la réparation des cassures d'ADN par excision de nucléotides. Les deux processus de transcription et de réparation sont en compétition, et, en présence de lésions au niveau de l'ADN, TFTC préfère se lier sur des lésions pour acétyler les histones et pour faciliter la réparation (Brand et al., 2001) (Figure 29).

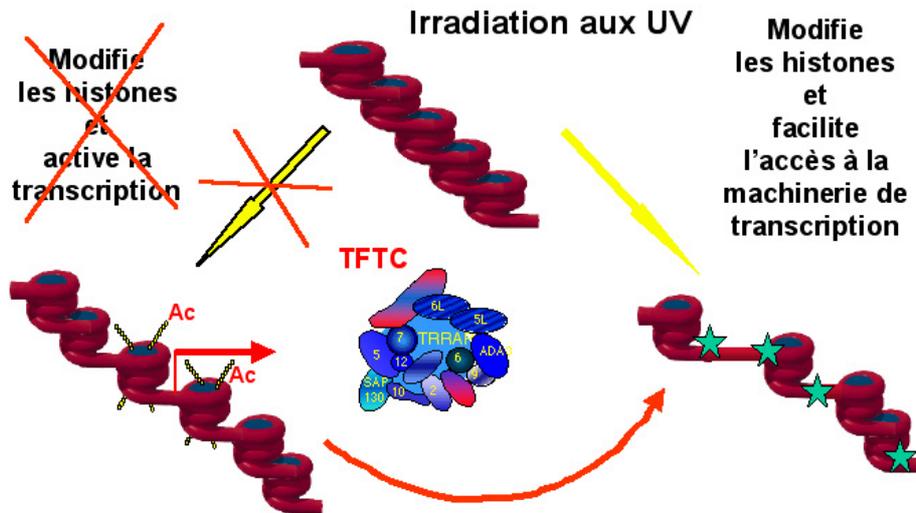


Figure 29 : TFC, doué d'activité HAT, est impliqué dans l'activation de la transcription ou dans la réparation par excision de nucléotides

4.6 – Assemblage des protéines en complexes : brève discussion

L'isolement de complexes multiprotéiques a beaucoup contribué à la compréhension du fonctionnement des protéines *in vivo*. Nous savons maintenant que les protéines n'agissent pas isolément mais associées entre elles pour exercer des fonctions particulières.

Cependant, il est parfois délicat de discriminer entre les activités enzymatiques de complexes entiers ou de protéines isolées. Par exemple, TIP48 et TIP49 seules semblent douées de la même activité enzymatique que lorsqu'elles sont agencées dans le complexe TIP60. Dans d'autres cas, un gain d'activité enzymatique a pu être observé lorsque les protéines sont agencées en complexes. C'est l'exemple du complexe SAGA qui peut acétyler les histones agencées en nucléosome, alors que la protéine GCN5 recombinante n'est pas douée de cette activité. Cet exemple permet de mieux comprendre pourquoi les protéines peuvent se réunir en complexes ; elle peuvent participer à la reconnaissance d'un substrat. Si l'association de protéines en complexes permet un gain de fonction par rapport à la protéine seule, il est tout à fait possible qu'elle provoque également une perte de fonction en empêchant l'accès à la protéine, par exemple.

La dynamique d'association et de dissociation des protéines en complexes doit être particulièrement importante pour comprendre la fonction qu'elles exercent *in vivo*. Ce type d'études implique des techniques d'extinction de fluorescence difficiles à mettre en place pour une vingtaine de protéines d'un même complexe protéique. Ainsi les études fonctionnelles de complexes multiprotéiques s'avèrent délicates *in vivo*. Les grands complexes multiprotéiques sont capables de s'agencer en sous-complexes ; la composition protéique de chaque complexe est modulable. Il serait maintenant déterminant de comprendre quels stimuli induisent l'assemblage et le désassemblage des facteurs protéiques en complexes très stables (stimuli externes, cycle cellulaire, différentes étapes de la transcription, etc....).

Si on combine à ces études le fait que les activités enzymatiques peuvent être modifiées par des modifications post-traductionnelles, on peut imaginer le degré de complexité des études portant sur ces grands complexes de protéines.

5 – FOCALISATION DU TRAVAIL DE THESE SUR L'ETUDE DE LA PROTEINE HTRRAP (TRANSFORMATION/TRANSCRIPTION-DOMAIN-ASSOCIATED PROTEIN)

5.1 – Quelques informations sur la protéine hTRRAP

hTRRAP est une grande protéine de 434 kDa qui possède d'importantes homologies de séquences avec les protéines kinases de la famille PIKK (McMahon et al., 1998)(Figure 30). Elle comporte notamment un domaine kinase du même type que les protéines ATM en sa partie C-terminale (PI3K), mais les résidus nécessaires à l'activité kinase ont muté. Ainsi la protéine hTRRAP est dénuée d'activité kinase, et est incapable de s'autophosphoryler comme les autres protéines de la famille des PIKK (McMahon et al., 1998 ; Vassilev et al., 1998). La protéine hTRRAP partage également les domaines FAT (FRAP, ATM, TRRAP) et FATC (FRAP, ATM et TRRAP en C-terminal) avec les protéines de la famille PIKK.

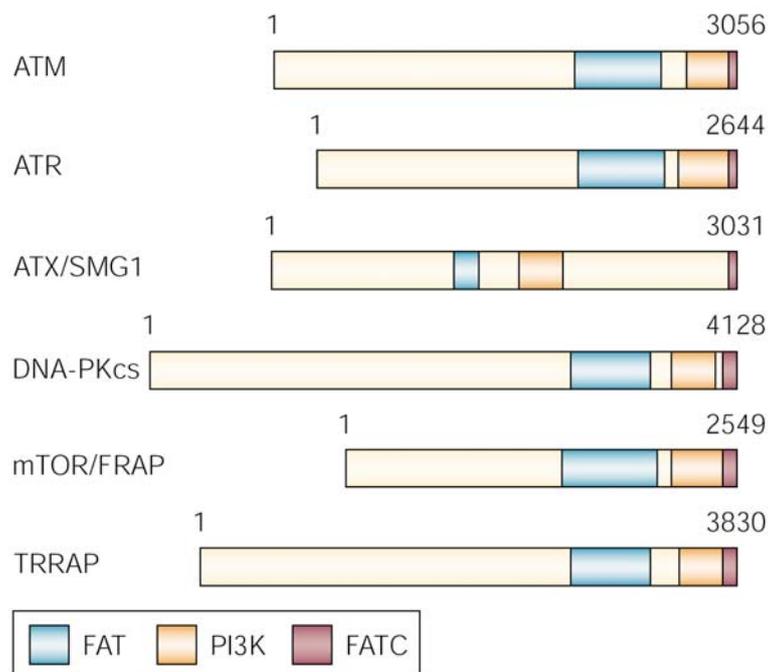


Figure 30 : Famille PIKK : taille et motifs en commun, d'après (Shiloh, 2003)

Le nombre de résidus est indiqué pour chaque protéine. Cette famille est composée de six protéines, qui sont toutes douées d'activité kinase, à l'exception de la protéine TRRAP. Ces protéines partagent trois domaines : les domaines FAT et FATC de fonction inconnue (le domaine FAT d'ATM contient un domaine de phosphorylation au niveau de la sérine 1981 qui est phosphorylée lors de l'activation d'ATM). Le domaine PI3K est le site catalytique de ces kinases.

Des domaines communs sont partagés entre hTRRAP et les protéines de la famille des PIKK, mais aucune fonction spécifique n'a pu être attribuée à hTRRAP.

Les protéines de la famille ATM, comme nous le voyons plus en détail dans le chapitre 6.2.4.1.2, sont impliquées dans la signalisation suite à l'induction de cassures doubles-brins au niveau de l'ADN (DSB : *Double Strand Break*). Des études proposent que hTRRAP intervienne dans les mêmes processus que les ATM, mais cela n'a pas été prouvé par voie expérimentale.

Très bien conservée au cours de l'évolution, hTRRAP possède un homologue chez la levure, Tra1 (Saleh et al., 1998). Comme pour hTRRAP, aucune activité kinase n'a pu être associée à la protéine Tra1 (Saleh et al., 1998). Ces deux homologues, Tra1 et hTRRAP, sont retrouvés dans divers complexes associés à des activités HATs, comme SAGA (Grant et al., 1998b) et NuA4 (Allard et al., 1999) pour Tra1, ou encore TFIIIC, STAGA, PCAF, TIP60 pour hTRRAP. La composition des complexes SAGA et STAGA/TFIIIC/PCAF est également très bien conservée au cours de l'évolution, suggérant que hTRRAP s'associe d'une manière stable avec ses interactants.

Les complexes multiprotéiques qui intègrent la protéine hTRRAP sont répertoriés dans une première partie de ce chapitre « hTRRAP ». Puis, dans une deuxième partie, quelques données fonctionnelles concernant hTRRAP sont décrites, notamment son implication dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans l'activation de la transcription. Une éventuelle implication de la protéine hTRRAP dans la réparation des cassures d'ADN y sera discutée.

5.2 – hTRRAP au sein de divers complexes multiprotéiques

La protéine hTRRAP est une sous-unité présente dans toute une panoplie de complexes multiprotéiques dont la plupart sont capables d'acétyler les histones (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des complexes contenant la protéine TRRAP

| Complexe | SAGA | SLIK/SALSA/ SAGA-alt | PCAF | STAGA | TFTC | NuA4 | Tip60 | p400 | TBAF |
|--|----------------|----------------------------|---------------|-----------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Organisme | levure | levure | humain | humain | humain | levure | humain | humain | humain |
| Substrat | H3/H2B | H3/H2B | H3/H4 | H3/H2B | H3/H2B | H4/H2A | H4/H2A | - | - |
| Sous-unité HAT | yGcn5 | yGcn5 | PCAF | hGcn5L | hGcn5L | Esa1 | Tip60 | - | - |
| | Tra1 | Tra1 | PAF400 | TRRAP | TRRAP | Tra1 | TRRAP | TRRAP | TRRAP |
| | yAda1 | yAda1 | - | STAF42 | - | Act1 | actine | actine | - |
| | yAda2 | yAda2 | hAda2 | - | - | Arp4 | BAF53 | BAF53a | BAF53 |
| | yAda3 | yAda3 | hAda3 | STAF54 | hAda3 | Epl1 | EPCc | Epc1 | - |
| | yAda5/Spt20 | yAda5/Spt20 | - | - | - | Eaf3 | - | - | - |
| | ySpt3 | ySpt3 | hSpt3 | hSpt3 | hSpt3 | Yng2 | - | - | - |
| | ySpt7 (entier) | ySpt7 (troncature C-term.) | - | STAF65 γ | SPT7 | Yaf9 | - | - | - |
| | yTAF5 | YTAF5 | - | - | hTAF5 | - | p400 | p400 | - |
| Sous-unités accessoires | - | - | hTAF5L | hTAF5L | hTAF5L | - | Tip48 | Tip48 | Tip48 |
| | yTAF6 | yTAF6 | - | - | hTAF6 | - | Tip49 | Tip49 | Tip49 |
| | - | - | hTAF6L | hTAF6L | hTAF6L | - | - | - | - |
| | yTAF9 | yTAF9 | hTAF9 | hTAF9 | hTAF9 | - | - | - | - |
| | yTAF10 | yTAF10 | hTAF10 | hTAF10 | hTAF10 | - | - | - | - |
| | yTAF12 | yTAF12 | hTAF12 | hTAF12 | hTAF12 | - | - | - | - |
| | - | - | - | SAP130 | SAP130 | - | - | - | - |
| | Sgf73 | - | - | Ataxin7 | Ataxin7 | - | - | - | - |
| | Sgf11 | - | - | Ataxin7-L3? | Ataxin7-L3? | - | - | - | - |
| Sous-unités spécifiques au complexe | ySpt8 | - | STAF36 | STAF36 | STAF36 | Eaf1 | - | - | - |
| | Sgf29 | Rtg2 | STAF46 | STAF46 | STAF46 | Eaf2 | - | - | - |
| | Ubp8 | - | STAF55 | STAF55 | STAF55 | Eaf5 | - | - | - |
| | - | - | STAF60 | STAF60 | STAF60 | Eaf6 | - | - | - |

5.2.1 – hTRRAP dans les complexes TFIIIC, PCAF, STAGA

(voir chapitre 4.5.2, 4.5.3 et 4.5.4)

Ces complexes possèdent tous une activité HAT.

5.2.2 – hTRRAP dans le complexe TIP60

(voir Chapitre 4.2.1)

Ce complexe est également doué d'une activité HAT.

5.2.3 – hTRRAP dans les complexes liés à c-myc ou à E1A

hTRRAP a été isolée en interaction avec les oncogènes c-myc et E1A. Certaines équipes ont alors tenté de purifier les complexes liés à c-myc ou à E1A. Au final, ces complexes possèdent de nombreuses similarités avec le complexe TIP60 ou NuA4 chez la levure.

5.2.3.1 – c-myc, brève introduction

L'oncoprotéine c-myc fonctionne comme un facteur de transcription qui a la capacité de transformer des cellules normales en cellules tumorales, et joue un rôle direct dans la prolifération cellulaire normale. La protéine c-myc permet de recruter des cofacteurs nucléaires au niveau de certains promoteurs, ce qui provoque l'activation de la transcription.

5.2.3.2 – hTRRAP et les complexes liés à c-myc

En 2000, l'équipe du Dr Cole a découvert que c-myc recrute l'HAT hGCN5 et que cette enzyme est cruciale pour l'activité oncogénique de c-myc (McMahon et al., 2000). Par la suite, ce groupe a isolé des cofacteurs liés à c-myc comme hGCN5, hTRRAP, TIP48, TIP49 ainsi que BAF53. Ils distinguent dans leur étude plusieurs complexes associés à BAF53 : BAF53/TIP48/TIP49, puis BAF53/hTRRAP. Il est assez surprenant de constater que la protéine TIP60 n'a pas été détectée dans le complexe hTRRAP/BAF53 ainsi dépourvu d'activité HAT (Park et al., 2002). Ce résultat est contredit par des études ultérieures menées *in vivo* en CHIP qui ont montré que c-myc, hTRRAP, TIP48/TIP49 et TIP60 sont conjointement recrutés sur un promoteur (Frank et al., 2003). *In vivo*, la présence du domaine HAT de TIP60 est importante pour acétyler les histones H4 (Frank et al., 2003) et la présence de c-myc au niveau du promoteur est nécessaire à l'acétylation des histones H3 et H4 *in vivo* (Fernandez et al., 2003). Ainsi, c-myc est très probablement lié à plusieurs types d'activités HAT, ciblant soit H3 (GCN5), soit H4 (TIP60).

D'une manière intéressante, des études de stabilité du facteur c-myc suggèrent que c-myc est lui-même acétylé par GCN5 et TIP60 (Patel et al., 2004). Le rôle des HATs GCN5 et TIP60 dans l'activation de la transcription par c-myc est double : acétyler d'une part les histones et d'autre part c-myc, ce qui conduit à la stabilisation de ce facteur.

De nombreuses protéines se lient à l'oncogène c-myc, seules ou sous forme de complexes. c-myc recrute GCN5 ainsi que d'autres sous-unités du complexe STAGA (Liu et al., 2003b), mais aussi la protéine TIP60 ainsi que d'autres sous-unités du complexe TIP60

(Ikura et al., 2000). Or, ces complexes ont en commun la protéine hTRRAP, qui se lie directement à c-myc. Un modèle tout à fait intéressant suggère que la liaison de hTRRAP au niveau du promoteur permette de recruter les autres cofacteurs, notamment ceux doués d'activité HAT, tels que TIP60 et GCN5 (Memedula and Belmont, 2003).

5.2.3.3 – L'oncoprotéine E1A, brève introduction

L'oncoprotéine E1A d'adénovirus provoque divers dégâts dans les cellules infectées : immortalisation et blocage de la différenciation (pour revue (Mymryk and Bayley, 1994)). Les fonctions de E1A dans les cellules sont en partie dues à sa liaison avec de nombreuses protéines, comme le suppresseur de tumeurs pRB, des coactivateurs transcriptionnels tels que p300/CBP, hGCN5 ou hTRRAP. La liaison de E1A induit des modifications fonctionnelles pour les protéines liées. Par exemple, la liaison de p300 à E1A a pour conséquence d'inhiber l'activité HAT de p300. De même, lorsque E1A lie hTRRAP et hGCN5 juste après l'infection, ces facteurs se trouvent séquestrés, et l'activation de la transcription médiée par c-myc et E2F s'en trouve inhibée *in vivo* (Lang et al., 2001).

5.2.3.4 – hTRRAP et les complexes liés à E1A

La protéine hTRRAP interagit avec E1A, seule ou sous la forme d'un complexe multiprotéique. L'équipe du Dr Livingston a isolé un complexe multiprotéique en interaction avec E1A composé des protéines p400, c-myc, TRRAP, TIP48 TIP49, les « *actin-like proteins* » et l'homologue humain de la protéine initiateur de Polycomb chez la Drosophile. De nombreuses sous-unités sont partagées par ce complexe et le complexe TIP60. Toutefois, le complexe p400 isolé par l'équipe du Dr Livingston ne contient pas la protéine TIP60 et il est dépourvu d'activité HAT (Fuchs et al., 2001).

5.2.4 – hTRRAP au sein de complexes doués ou dénués d'activités HATs

La protéine hTRRAP est retrouvée au sein de différents complexes multiprotéiques. En général, ces complexes sont capables d'acétyler les histones (complexes du type TFIIIC ou bien les complexes TIP60, certains complexes liés à c-myc), mais certains sont dépourvus de ce type d'activité (certains complexes liés à E1A ou à c-myc). Des complexes dont la composition est très proche sont pourvus ou dépourvus d'activité HAT. Ce constat suppose l'existence d'une régulation intracellulaire qui participerait à l'intégration de sous-unités HATs aux différents complexes.

5.3 – Fonctions associées à hTRRAP

5.3.1 – Coactivateur transcriptionnel

5.3.1.1 – Tra1 se lie directement à des activateurs transcriptionnels

Chez la levure, Tra1 est essentiel au recrutement de complexes HAT lors de l'activation de la transcription. Deux complexes multiprotéiques, SAGA et NuA4, qui contiennent Tra1, interagissent avec des domaines d'activation acides et stimulent l'activation de la transcription sur une matrice de chromatine *in vitro* (Ikeda et al., 1999 ; Utley et al., 1998 ; Vignali et al., 2000). Tra1 semble responsable de la liaison d'activateurs acides à SAGA et/ou NuA4, puisqu'elle peut interagir spécifiquement avec les domaines acides de VP16, GCN4, GAL4 et HAP4 (Bhaumik et al., 2004 ; Brown et al., 2001a ; Qiu et al., 2005). Tra1 joue donc un rôle central dans l'activation de la transcription en connectant différents activateurs aux cofacteurs SAGA et NuA4.

5.3.1.2 – La liaison de TRRAP à c-myc, E2F, p53 et aux récepteurs nucléaires

hTRRAP interagit spécifiquement avec la partie N-terminale de c-myc et avec le domaine de transactivation de E2F-1 (Lang et al., 2001). Lorsque l'expression de hTRRAP est inhibée, la transformation oncogénique médiée par c-myc est bloquée. hTRRAP est donc impliqué dans l'activation de la transcription par c-myc (McMahon et al., 1998).

hTRRAP interagit également avec les récepteurs nucléaires (ER α , VDR, PPAR γ) (Yanagisawa et al., 2002) grâce à la présence de trois motifs LXXLL au centre de TRRAP. TRRAP est donc un cofacteur des récepteurs nucléaires et active la transcription en présence du ligand correspondant au récepteur.

Enfin, la protéine hTRRAP a également été retrouvée en interaction avec la protéine p53 *in vitro* (chromatographie d'affinité GST) et *in vivo* (immunoprécipitation de lysats de cellules 293) (Ard et al., 2002).

hTRRAP s'impose comme un coactivateur essentiel dans l'activation de la transcription par c-myc, p53 et les récepteurs nucléaires ; comme Tra1, ce facteur interagit directement avec les activateurs transcriptionnels.

5.3.1.3 – TRRAP : un tremplin pour le recrutement des enzymes doués d'activité HAT

hTRRAP est associée à des complexes contenant des protéines douées d'activité HAT telles que TIP60 (acétylation de H4 et H2A) et hGCN5 (acétylation de H3).

hTRRAP est à l'origine du recrutement de GCN5 lors de l'activation de la transcription par c-myc (McMahon et al., 2000). Des mutations ou délétions dans le domaine ATM de hTRRAP ont montré que ce domaine est essentiel au recrutement de GCN5 ainsi qu'à l'activité HAT associée à GCN5 au niveau de c-myc (Park et al., 2001).

Par exemple, l'expression du gène TERT nécessite la liaison de la protéine hTRRAP au niveau du promoteur de TERT et le recrutement consécutif d'HAT ciblant H4 et H3 (Nikiforov et al., 2002). D'autre part, la partie N-terminale de Myc est capable d'interagir avec le complexe STAGA entier *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2003b).

De nombreuses preuves montrent que TRRAP intervient dans l'activation de la transcription par c-myc et que l'activité HAT est essentielle à l'activation de la transcription. Un rôle d'adaptateur, de plateforme d'interactions, a alors été suspecté pour la protéine hTRRAP. Après s'être liée à l'activateur c-myc, hTRRAP permettrait de recruter des enzymes doués d'activité HAT durant l'activation de la transcription.

Cette fonction a également été proposée pour hTRRAP lors de l'activation de la transcription par p53. La fixation de la protéine hTRRAP à p53 déclenche l'augmentation de l'acétylation des histones (Ard et al., 2002). Lorsque l'expression de TRRAP est inhibée, les histones ne sont plus acétylées, empêchant alors l'activation de la transcription par p53.

hTRRAP est également responsable du recrutement des HATs TIP60 et PCAF au niveau des promoteurs des gènes Mad1 et Mad2 (Li et al., 2004).

Ainsi, plusieurs études (Ard et al., 2002 ; Li et al., 2004 ; Liu et al., 2003b ; Nikiforov et al., 2002) tendent à prouver que hTRRAP joue un rôle de tremplin pour recruter les activités HATs au niveau de promoteurs.

5.3.2 – Régulation du cycle cellulaire

La double mutation de la protéine hTRRAP est létale chez la souris au stade embryonnaire précoce, ce qui semble lié à un défaut dans la progression du cycle cellulaire. Plus précisément, la perte de hTRRAP résulte en une accumulation des cellules en phase G2 et une endoréplication conduisant à une polyploïdie (Herceg et al., 2001). Les cellules déficientes en TRRAP initient l'anaphase alors même que la ségrégation des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique n'est pas terminée. L'absence de TRRAP provoque un défaut au niveau des points de contrôle G2/M et pendant la mitose. La perte de TRRAP compromet la transcription des protéines Mad1 et Mad2 impliquées dans les points de contrôle au niveau de la mitose (Li et al., 2004). L'analyse de l'expression des gènes à grande échelle sur des cellules normales ou KO TRRAP implique TRRAP dans la transcription de gènes qui s'expriment en fonction du cycle cellulaire (Herceg et al., 2003). Enfin, TRRAP s'associe avec E2F et c-myc, lesquels régulent l'expression de gènes clés contrôlant les transitions G1/S et G2/M.

A l'heure actuelle, de nombreuses expériences montrent que TRRAP joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire.

5.3.3 – hTRRAP et la réparation de l'ADN

Nombreux sont les indices permettant de suspecter une implication de TRRAP dans la réparation de l'ADN, mais aucune preuve expérimentale n'a clairement démontré le rôle de cette protéine dans les différents processus de réparation.

Premièrement, la protéine hTRRAP fait partie intégrante de complexes multiprotéiques, qui, comme nous l'avons vu, sont impliqués dans la réparation de l'ADN. Ainsi hTRRAP est retrouvée dans les complexes TFIIIC/STAGA impliqués dans la réparation

par excision de nucléotides de même que dans le complexe TIP60 impliqué dans la réparation des cassures double-brin.

Deuxièmement, hTRRAP, en tant que coactivateur transcriptionnel, pourrait intervenir dans la réparation de l'ADN en activant la transcription de gènes codant pour des acteurs de la réparation. On connaît le rôle de p53 dans la coordination de la réponse cellulaire suite aux dommages causés à l'ADN (Buscemi et al., 2001). Or, la protéine hTRRAP constitue un coactivateur important lors de l'activation de la transcription par p53 (Ard et al., 2002). Il y a fort à parier que TRRAP est impliquée dans l'activation de la transcription de certains gènes suite à l'induction de dommages d'ADN. Pourtant, aucune étude n'établit clairement le rôle de TRRAP dans la transcription suite à des dommages causés à l'ADN.

Troisièmement, hTRRAP fait partie de la famille des ATM/DNA-PK, protéines qui interviennent dans la réparation de l'ADN. Les cellules dans lesquelles ATM a été muté présentent des défauts au niveau du point de contrôle G2/M, et une accumulation des cellules en phase G2 après exposition à des radiations ionisantes. L'équipe du Dr Herceg a désiré connaître le comportement des cellules déplétées en TRRAP après l'induction de DSB. Les cellules déficientes en TRRAP, comme les cellules déficientes en ATM, s'accumulent au niveau de la phase G2 après irradiation (Herceg et al., 2001 ; Herceg et al., 2003). TRRAP pourrait partager certaines fonctions avec les protéines ATM.

Malgré ces études, le rôle de TRRAP au niveau de la réparation des cassures double-brins reste une hypothèse. TRRAP peut être impliquée indirectement dans la réparation des DSB, en intervenant au niveau des voies de signalisation, ou bien en activant la transcription de gènes impliqués dans la réparation, mais ces suppositions restent à étayer. TRRAP pourrait également intervenir directement pour réparer les cassures d'ADN. Cette hypothèse a été testée et se trouve discutée dans le chapitre III de la partie résultats de la présente thèse.

6 – COUPLAGE TRANSCRIPTION/REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN

6.1 – hTRRAP à l'interface de la transcription et de la réparation

La protéine hTRRAP se retrouve au sein de nombreux complexes multiprotéiques impliqués dans divers processus tels que l'activation et l'initiation de la transcription (comme les complexes de type TFIIIC) ainsi que la réparation des cassures doubles-brins de l'ADN (tels que le complexe TIP60). hTRRAP est à l'interface de deux fonctions cellulaires qui sont par ailleurs couplées : la transcription et la réparation de l'ADN. Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, la protéine hTRRAP s'associe avec des protéines douées d'activité HAT, telles que TIP60 et GCN5. Ces activités HATs sont impliquées dans le processus de transcription, mais peuvent également jouer un rôle dans la réparation de l'ADN en facilitant l'accès à l'ADN des facteurs de réparation.

6.2 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN dans le contexte de la chromatine

Les cassures double-brin d'ADN sont fréquentes chez les eucaryotes, et elles doivent être rapidement réparées afin de conserver l'information génétique. Une déficience au niveau de la réparation de l'ADN conduit à une accumulation de mutations dans le génome, et à la transformation cancéreuse ou à la mort cellulaire programmée (apoptose). Les cassures d'ADN peuvent être provoquées par divers agents, endogènes ou exogènes. Parmi eux, l'exposition à des radiations ionisantes ainsi qu'à des agents chimiques tels que le MMS conduisent à des cassures au niveau des deux brins complémentaires de l'ADN. Ces cassures sont particulièrement dangereuses pour la cellule, car le brin complémentaire ne peut plus servir de modèle, comme c'est le cas pour la réparation de cassure simple-brin de l'ADN. La chromatide-soeur de la séquence à réparer peut alors servir de modèle pour réparer la cassure par **recombinaison homologue** (HR). Bien que ce mode de réparation de l'ADN soit fidèle, il n'est pas très fréquent *in vivo*. Les cellules préfèrent réparer les cassures double-brin de l'ADN par un autre mécanisme : le processus de liaison d'extrémités d'ADN non homologues nommé **NHEJ** (*Non Homologous End Joining*), qui génère plus d'erreurs. Ces deux processus sont décrits ici et plus particulièrement celui de réparation par NHEJ.

Par ailleurs, les facteurs de réparation doivent passer la barrière de la chromatine pour accéder aux sites de cassures.

6.2.1 – Implication des modifications post-traductionnelles dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Les processus de réparation des DSBs (*Double Strand Breaks*) impliquent certaines modifications post-traductionnelles au niveau de l'extrémité N-terminale des histones, telles que l'acétylation et la phosphorylation (pour revue, (Bhaumik and Green, 2002; Gontijo et al., 2003)). L'influence de ces combinaisons différentes de modifications post-

traductionnelles dans le processus de réparation de l'ADN n'a pas encore été très étudiée, mais, comme dans la transcription, est probablement impliquée dans la reconnaissance spécifique de facteurs de réparation.

6.2.1.1 – La phosphorylation des histones est un marqueur de la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Après induction de cassures double-brin, l'histone variant **H2AX** va être rapidement **phosphorylée**, et sera alors nommée γ H2AX. Cette modification apparaît sur de larges régions de la chromatine autour du site de cassure (quelques mégabases chez les mammifères, quelques kilobases chez la levure)(Furuta et al., 2003; Rogakou et al., 1999). Cette modification est catalysée par les membres de la famille des kinases PI3K (*Phosphatidyl Inositol-3 related Kinase*). Chez les mammifères, cette famille compte plusieurs protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles-brins, dont **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), **ATR** (*AT-Related*) et DNA-PK (protéine kinase dépendante de l'ADN). Chez la levure, les homologues des ATR/ATM, Mec1p et Tel1p sont tous deux requis pour la phosphorylation de H2AX.

La manière dont ces kinases reconnaissent la présence de dommages dans l'ADN n'est toujours pas claire. Des études biochimiques ont montré que la kinase Mec1 se lie aux extrémités d'ADN, ce qui implique un modèle dans lequel les kinases seraient directement recrutées par la cassure elle-même (Cramer et al., 2000). Contrairement à cette hypothèse, Bakkenist *et al.* suggèrent que les cassures double-brin perturbent l'organisation de la chromatine, ce qui entraîne une activation des kinases. Dans ce modèle, les dommages causés à l'ADN activent les protéines kinases par une voie indirecte (Bakkenist and Kastan, 2003).

Si le mode d'activation des kinases est encore discuté, leur participation dans la réparation des cassures d'ADN n'est plus remise en doute. Chez la levure, des mutations de H2A dans son domaine de liaison aux kinases induisent un défaut de réparation par NHEJ (Cramer et al., 2000). La phosphorylation de H2AX est aussi impliquée dans la réparation par recombinaison homologue. Les souris *H2AX*^{-/-} présentent une sensibilité accrue aux irradiations, une déficience immunitaire et une instabilité génomique (Celeste et al., 2002). Lorsque l'inactivation d'une copie de H2AX est combinée à une déficience en p53, la probabilité de développer des tumeurs est accrue (Celeste et al., 2003a).

Ainsi la phosphorylation de l'histone H2AX est un événement majeur de la réparation de l'ADN, impliqué dans différents mécanismes pour réparer les cassures (NHEJ et recombinaison homologue). H2AX phosphorylée intervient également dans la voie de signalisation apoptotique par p53.

Le **rôle précis de la phosphorylation de l'histone H2AX** n'est cependant pas encore bien compris. Il a d'abord été suggéré que cette modification facilite le **recrutement de facteurs de réparation au niveau des sites de cassures** (Rogakou et al., 1999). Le domaine BRCT (pour *BRCA1 COOH Terminal*), partagé par quelques facteurs de réparation intervient dans la reconnaissance de H2AX phosphorylée. Les facteurs le possédant, tels que Nbs1, se lient directement à la forme phosphorylée de H2AX (Kobayashi et al., 2002). Cependant, une étude montre que les protéines Brca1 et Nbs1 continuent d'être recrutées au niveau des sites de cassure même en l'absence de H2AX (Celeste et al., 2003b). La fonction de la

phosphorylation de H2AX dans le recrutement des facteurs de transcription n'est donc toujours pas claire.

Par contre, son rôle dans la formation de **foyers de réparation** est plus évident. Dans les cellules de mammifères, les facteurs de réparation recrutés sur les sites de cassures d'ADN se regroupent en foyers détectables par immunofluorescence (IRIFs pour *Irradiation-Induced Foci*) (pour revue, (Koundrioukoff et al., 2004)). Ces foyers contiennent une centaine de facteurs de réparation et peuvent contenir plusieurs sites de cassure au niveau de l'ADN. Or, la perte de H2AX empêche la formation de ces foyers de réparation (Celeste et al., 2003b). Ces études indiquent que la phosphorylation de H2AX permet la rétention des facteurs de réparation autour des sites de cassure et donc la formation des foyers de réparation.

En outre, la phosphorylation de H2AX facilite également le recrutement de facteurs capables de moduler la structure de la chromatine, tels que les facteurs remodelant la chromatine en présence d'ATP (SWI/SNF) ou bien des facteurs acétylant les histones (Kusch et al., 2004).

La phosphorylation de H2AX constitue un événement central de la réponse cellulaire suivant l'induction de DSBs. Celui-ci a été qualifié de « **détecteur** » de cassures, car il permet la formation des foyers de réparation. Cependant, la modification de H2AX n'est probablement pas le premier événement de détection puisque dans le cas où H2AX est déficient, un recrutement de facteurs de réparation, différent des IRIF, est observé. D'autres protéines telles que les ATM/ATR et le complexe MRN, décrits dans les paragraphes suivants, sont des candidats plus probables que H2AX pour la détection des cassures d'ADN.

6.2.1.2 – Acétylation des histones et réparation des cassures double-brin de l'ADN

Plusieurs études suggèrent une implication de l'acétylation des histones dans la réparation des cassures double-brin et notamment dans le processus dit de NHEJ.

Chez la levure, la protéine **Esa1**, douée d'activité HAT ciblée sur les histones H4 (voir chapitre TIP60, n° 3.4.2.4.1), est requise pour un bon déroulement du **NHEJ** (Bird et al., 2002). Un mutant de l'histone H4 dans lequel toutes les lysines sont remplacées par des glutamines provoque un phénotype sensible aux agents provoquant des lésions double-brin à l'ADN, comme la camptothécine (CPT) et le méthyl-méthane sulfonate (MMS). Ces mutants sont défectueux dans la réparation des cassures d'ADN par NHEJ et par une autre voie de réparation couplée à la réplication. Ils s'arrêtent en phase G2 de façon dépendante de Rad9, protéine impliquée dans l'activation du point de contrôle G2/M (Bird et al., 2002 ; Megee et al., 1995). La présence des lysines de l'histone H4 est donc requise pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN. D'autre part, les mutants de Esa1 montrent la même sensibilité aux agents induisant les DSBs que les mutants de l'histone H4. *In vitro*, le complexe NuA4, qui contient l'HAT Esa1, acétyle de préférence les histones sur un substrat linéaire, plutôt que circulaire, ce qui montre que Esa1 intervient sur les dommages spécifiquement dans un contexte chromatinien (Bird et al., 2002). Il est très probable que

l'acétylation des histones H4 par Esa1 joue un rôle dans la réparation des cassures double-brin, de même que l'homologue humain de Esa1, TIP60 (Ikura et al., 2000).

Il a récemment été démontré chez la drosophile que **TIP60 acétyle les histones H2av phosphorylées** suite à l'induction de cassures double-brin, et facilite l'échange de cet histone H2av modifiée par l'histone H2A classique (Kusch et al., 2004). L'acétylation des histones par certaines HATs constitue donc une étape clé de la réparation des DSBs.

Outre les HATs TIP60 chez les mammifères ou Esa1 chez la levure, d'autres protéines douées d'activité HAT sont aussi impliquées dans la réparation de l'ADN. L'inactivation de l'HAT Gcn5, ciblant l'histone H3, augmente la sensibilité aux agents chimiques induisant des cassures double-brin tels que le MMS (Choy and Kron, 2002). Ainsi plusieurs types de **HATs** interviennent dans le processus de **réparation des cassures d'ADN double-brin**.

Mais à l'inverse, l'inhibition d'activité HAT aussi bien que la **déacétylation** d'histones sont requises pour réparer les DSBs par **NHEJ**. Des études montrent par exemple que l'HAT humaine hGCN5 interagit avec une protéine impliquée dans le NHEJ : Ku70. Cette interaction induit la phosphorylation de hGCN5 par un autre acteur du NHEJ, la DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), ce qui diminue l'activité HAT de hGCN5 (Barlev et al., 1998). Chez la levure, un complexe déacétylase, Sin3p/Rpd3p est requis pour que le NHEJ soit efficace (Jazayeri et al., 2004).

Comment deux activités à priori opposées, l'acétylation et la déacétylation des histones, peuvent être impliquées dans le même processus ? Il existe un modèle qui décompose le déroulement de la réparation de l'ADN en trois phases : la chromatine doit d'abord subir des modifications structurales afin faciliter son accès aux facteurs de réparation, puis dans un deuxième temps les acteurs des divers processus de réparation effectuent la réparation proprement dite, et enfin la structure de la chromatine doit être restaurée : c'est le modèle ARR (pour *Access, Repair, Restaure*)(pour revue, (Bhaumik and Green, 2002)). Dans ce cadre, l'acétylation des histones favoriserait l'accès de la machinerie de réparation à l'ADN, tandis que la déacétylation restaurerait le niveau d'acétylation de départ.

6.2.1.3 – Combinaison de différentes modifications post-traductionnelles

L'acétylation et la phosphorylation des histones sont peut-être des processus interdépendants. D'une part, le processus de phosphorylation de H2AX est activé lorsque les histones sont hyperacétylées (Park et al., 2003). D'autre part, le complexe TIP60 préfère acétyler le substrat H2AX déjà phosphorylé (Kusch et al., 2004). Ainsi les modifications post-traductionnelles des histones peuvent se combiner pour former un environnement propice aux différents processus de réparation des cassures double-brin.

6.2.1.4 – Autres modifications de la structure de la chromatine impliquées dans la réparation des cassures d'ADN

Outre leur phosphorylation et leur acétylation, les histones peuvent être **ADP-ribosylées** durant le processus de réparation. Cette modification est appliquée par les enzymes PARP-1 et PARP-2 (*Poly(ADP-ribose) polymérase 1 et 2*) au niveau des histones H1 et H2B, en réponse aux différents dommages subis par l'ADN. Or, l'addition de longues chaînes d'ADP-ribose diminue l'état de compaction de la chromatine (Bouchard et al., 2003) et donc contribue à la rendre accessible aux acteurs de la réparation.

Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, comme l'**ATPase Ino80**, interviennent également dans la réparation des cassures d'ADN. La délétion d'Ino80 chez la levure conduit à une hypersensibilité aux radiations et aux agents génotoxiques (Morrison et al., 2004). Chez les eucaryotes supérieurs, la mutation d'Ino80 affecte spécifiquement le processus de réparation par **recombinaison homologue** (Fritsch et al., 2004). Il semble donc qu'Ino80 contrôle en particulier l'accès des facteurs de recombinaison homologue à l'ADN.

Les cellules empruntent diverses voies pour faciliter l'accès des acteurs de la réparation aux sites de cassure : modifications post-traductionnelles des histones, (telles que l'acétylation, la phosphorylation de H2AX et l'ADP-ribosylation), ou encore remodelage de la chromatine ATP-dépendant. La machinerie de transcription aussi recrute des enzymes capables d'acétyler les histones et de modifier la structure de la chromatine ATP-dépendante. Ainsi, certains facteurs qui agissent au niveau de la chromatine (ex : Esa1, Gcn5, Ino80) participent aux deux processus de transcription et de réparation.

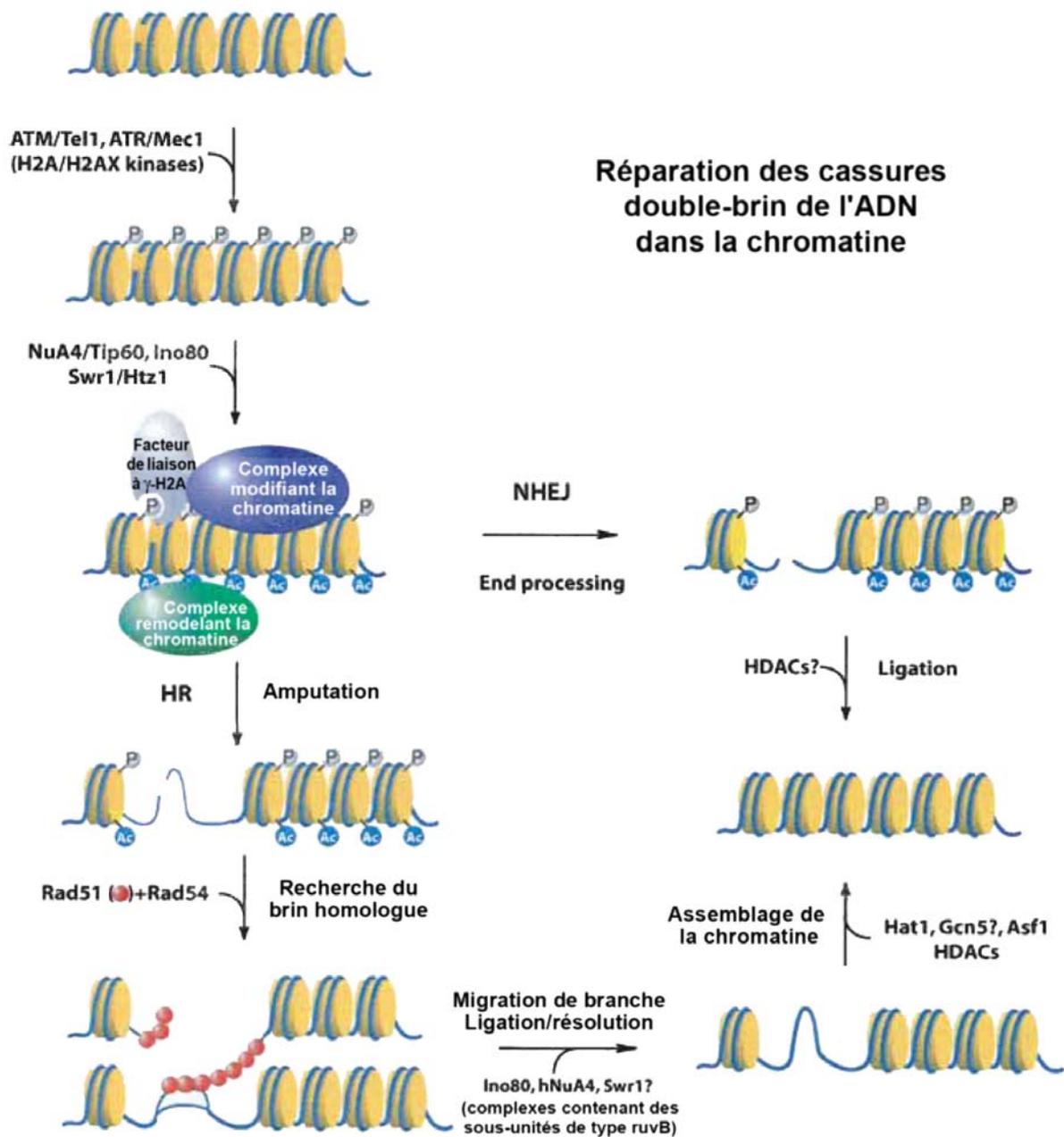


Figure 31 : mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN dans le contexte chromatinien, d'après (Peterson and Cote, 2004)

Après induction de DSBs, ATM et ATR vont phosphoryler H2AX, ce qui facilite la rétention de certains facteurs de remodelage de la chromatine. L'acétylation des histones, ainsi que le remodelage de la chromatine, se produisent dans les deux processus de réparation par NHEJ ou par recombinaison homologue. A la fin de la recombinaison homologue, l'assemblage de la chromatine est requis pour restaurer la structure de la chromatine de départ. En ce qui concerne le NHEJ, il a été montré le besoin de HDAC : la désacétylation des histones serait également nécessaire pour revenir à la structure chromatinienne de départ.

6.2.2 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (HR pour Homologous recombination)

Ce processus de réparation conduit dans la plupart des cas à une réparation sans erreur. Chez la levure, ce processus requiert les gènes *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* et *XRS2*. Ces protéines sont hautement conservées chez tous les eucaryotes et elles sont essentielles à la survie des cellules. Chez la levure, le processus de recombinaison homologue a été étudié grâce à l'expression de l'endonucléase HO qui coupe les deux brins d'ADN, ce qui permet de mimer une cassure. La séquence des événements a ensuite été suivie par immunoprécipitation de la chromatine (Paques and Haber, 1999 ; Sugawara et al., 2003 ; Wolner et al., 2003). Ces différents événements sont représentés dans la Figure 32.

Notons simplement que si l'ADN qui sert de modèle pour la réparation est absent, les DSB sont réparés par d'autres mécanismes comme le NHEJ.

A) Réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue

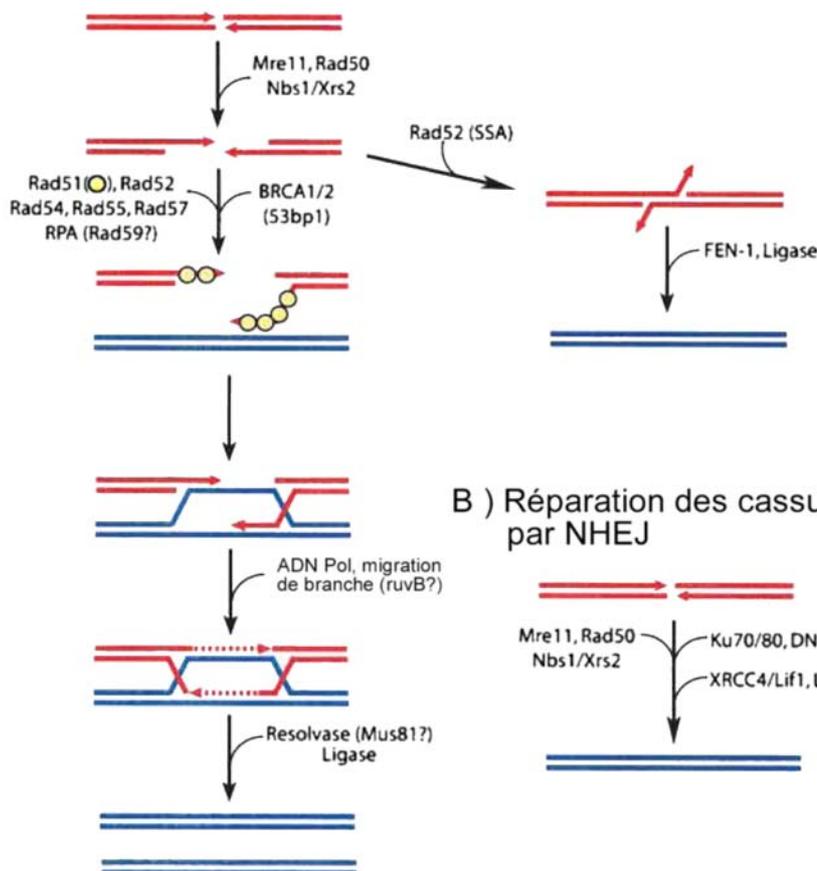


Figure 32 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin d'ADN par recombinaison homologue ou par NHEJ, d'après (Peterson and Cote, 2004)

A – mécanisme de réparation par recombinaison homologue. Après détection des DSBs, l'extrémité 5' est amputée, ce qui produit un long brin en 3'. Ce long brin en 3' va servir de substrat pour l'assemblage de Rad51

en nucléofilaments. S'assemblent également les protéines Rad52, Rad54, Rad55 et Rad57. Ce complexe de protéine cherche dans le génome des séquences homologues. La migration de branche est suivie de la synthèse d'ADN, et de la ligation et la résolution des jonctions de Holliday qui restaure les brins d'ADN. Un autre mode de réparation par recombinaison homologue est représenté ; le SSA (*Single-Strand Annealing*). Dans ce processus, Rad52 est également important pour la recherche de brin homologue, puis l'endonucléase FEN-1 remet en place les extrémités d'ADN libres, avant qu'elles soient liguées. Ce mécanisme conduit à des délétions à l'intérieur des séquences d'ADN.

B – Mécanisme de réparation par NHEJ. Dans ce cas, les extrémités d'ADN cassées sont directement remaniées pour être liguées sans recherche du brin homologue. Cette réparation conduit à des petites délétions au niveau des séquences religuées.

6.2.3 – Réparation des cassures double-brin de l'ADN par « NHEJ »

Les paragraphes précédents traitaient de l'importance des protéines modulant la structure de la chromatine pour réparer les DSBs. Certaines de ces protéines sont impliquées plus particulièrement dans un mécanisme spécifique de réparation, le processus de NHEJ.

Le « NHEJ » pour « *Non Homologous End Joining* », réalise la religation sans recours à un brin d'ADN homologue comme modèle. Comme cette réaction n'implique pas de brin d'ADN modèle, elle aboutit facilement à des erreurs dans la séquence d'ADN religuée.

6.2.4 – Les protéines impliquées dans la réparation des DSBs par NHEJ

Chez la levure, le processus de NHEJ requiert l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui se lie aux extrémités de l'ADN, rejoint par la kinase DNA-PKcs (kinase activée par la liaison de Ku au niveau des extrémités d'ADN), puis par la DNA ligase IV. Le complexe Mre11/RAD50/Xrs2, doué d'activité nucléase, est lui aussi impliqué dans ce processus (Paques and Haber, 1999).

Chez les eucaryotes, le complexe homologue Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) joue également un rôle dans le processus de NHEJ, ainsi que des protéines kinases dépendantes de l'ADN (DNA-PK) (Figure 32).

Les fonctions des kinases et du complexe MRN étant des plus variées, elles sont décrites ici en détail.

6.2.4.1 – Les protéines kinases au centre de la réparation des cassures double-brin de l'ADN

La réponse à l'induction de cassures de l'ADN est centrée sur une famille de kinases, les PI3Ks. Chez les mammifères, cela inclut plusieurs classes de protéines, ATM, ATR et DNA-PK (figure 30) Chez la levure, des protéines homologues aux ATM et ATR sont retrouvées, respectivement Tellp et Mec1p. Chez les mammifères, ATM est principalement activée après induction de cassures double-brin, alors que chez la levure, c'est Mec1p, l'homologue d'ATR.

Après avoir détecté les dommages, ces protéines kinases sont à l'origine d'une cascade de phosphorylations. Ces phosphorylations de diverses cibles sont à l'origine de différents processus cellulaires : l'activation des systèmes de réparation, le blocage du cycle cellulaire, ou bien encore l'induction de la mort cellulaire programmée.

6.2.4.1.1 – Implication des DNA-PK dans la réparation par NHEJ

Lors du processus de NHEJ, la liaison initiale de la protéine Ku au niveau des extrémités d'ADN est suivie par le recrutement de DNA-PKcs, dont la fonction kinase est alors activée (Gottlieb and Jackson, 1993 ; Lees-Miller et al., 1990).

Il a été proposé que ces protéines participent à la juxtaposition initiale des extrémités d'ADN (DeFazio et al., 2002).

Outre ce rôle structural, la DNA-PKcs est douée d'une activité kinase, activité clé de la signalisation des cassures d'ADN. La phosphorylation est ciblée soit sur la DNA-PK elle-même, soit sur divers acteurs de la réparation (Chan et al., 2002). L'autophosphorylation des DNA-PK est requise pour l'activation de leur fonction kinase. Ce processus d'autophosphorylation facilite également les réarrangements au niveau des extrémités d'ADN durant le NHEJ (Reddy et al., 2004). La phosphorylation d'autres substrats quant à elle, catalyse l'association de deux extrémités d'ADN (Gu et al., 1998) chez *Xenopus Laevis*. A l'inverse, lorsque des inhibiteurs de DNA-PK sont utilisés sur des extraits cellulaires humains, l'efficacité du NHEJ n'est pas affectée (Gu et al., 1998 ; Sekiguchi et al., 2001).

En phosphorylant des substrats très variés, DNA-PK intervient dans des processus cellulaires très divers. On pense aujourd'hui que l'activité kinase des DNA-PK joue un rôle plus général de régulateur de la réparation des DSBs. Cette idée est en accord avec l'implication de DNA-PK dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire (Chen et al., 2005 ; Collis et al., 2005 ; Li and Stern, 2005).

6.2.4.1.2 – Implication d'ATM et ATR dans la réparation des cassures doubles-brins de l'ADN

D'une manière générale, ATM est impliquée dans la balance entre l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation des DSBs (Abraham, 2003 ; Durocher and Jackson, 2001).

On considère que les kinases ATM et ATR partagent les mêmes substrats, mais qu'elles ne répondent pas aux mêmes types de lésions. Ainsi ATM est activée par irradiation ou exposition aux drogues radiomimétiques, tandis qu'ATR est activée en cas d'irradiation UV.

Les activités d'ATM et de DNA-PK quant à elles, peuvent être partiellement redondantes (Wang et al., 2005).

In vitro, ATM reconnaît les extrémités d'ADN et s'y fixe (Smith et al., 1999). L'induction de DSBs induit une autophosphorylation d'ATM. Dans la cellule, ATM existe sous la forme d'un multimère inactif, qui ne devient kinase fonctionnelle qu'en réponse à une lésion de l'ADN. Le monomère actif est phosphorylé sur un résidu Ser qui participe à la

dimérisation d'ATM. L'activation d'ATM résulterait de son autophosphorylation suite à l'apparition d'un DSB (Bakkenist and Kastan, 2003). Mais cette théorie est remise en cause par l'observation *in vitro* de dimères d'ATM reconstitués à partir de mutants non phosphorylables (Lee and Paull, 2005). Après activation, ATM phosphoryle d'autres substrats, tels que H2AX, NBS1, MRE11, p53, BRCA1, FANCD2 et Chk2.

Autoactivation et phosphorylation d'ATM sont dépendantes du complexe MRN. La phosphorylation de NBS1 est en effet requise pour que ATM phosphoryle d'autres substrats comme Chk2 ou H2AX (Lee and Paull, 2004). Ces études montrent une interdépendance entre ATM et le complexe MRN, qui peuvent chacun intervenir à plusieurs niveaux dans la détection des cassures double-brin.

ATM est capable de phosphoryler des substrats impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Tandis qu'ATR phosphoryle Chk1, ATM phosphoryle Chk2 (Iliakis et al., 2003). Ces phosphorylations entraînent l'activation des deux kinases Chk1 et Chk2, qui, en fonction des étapes du cycle cellulaire, déclenchent des cascades de signalisations spécifiques. Ces deux kinases participeront au contrôle du cycle cellulaire, et notamment au passage d'une phase du cycle à une autre (pour revue, (Iliakis et al., 2003)).

ATM phosphoryle également d'autres substrats, comme p53, ce qui conduit à la stabilisation de cet acteur majeur du processus apoptotique.

ATM phosphoryle divers substrats intervenant dans le processus de réparation des DSBs tels que Nbs1 (Lim et al., 2000) impliquée dans la réparation par HR et par NHEJ, ou bien Rad51 impliquée dans la réparation par HR (Chen et al., 1999b).

Actuellement on pense que le rôle des DNA-PK, ATM et ATR est d'amplifier les signaux cellulaires suite au recrutement de facteurs spécifiques au niveau des cassures d'ADN. Ce modèle nous permet d'envisager ces protéines ATM et ATR au sein de larges complexes multiprotéiques. D'ailleurs, un complexe contenant les protéines du complexe MRN avec ATM et l'hélicase BLM a été isolé : il s'agit du complexe BASC (pour *BRCA1-associated genome surveillance complex*) (Wang et al., 2000).

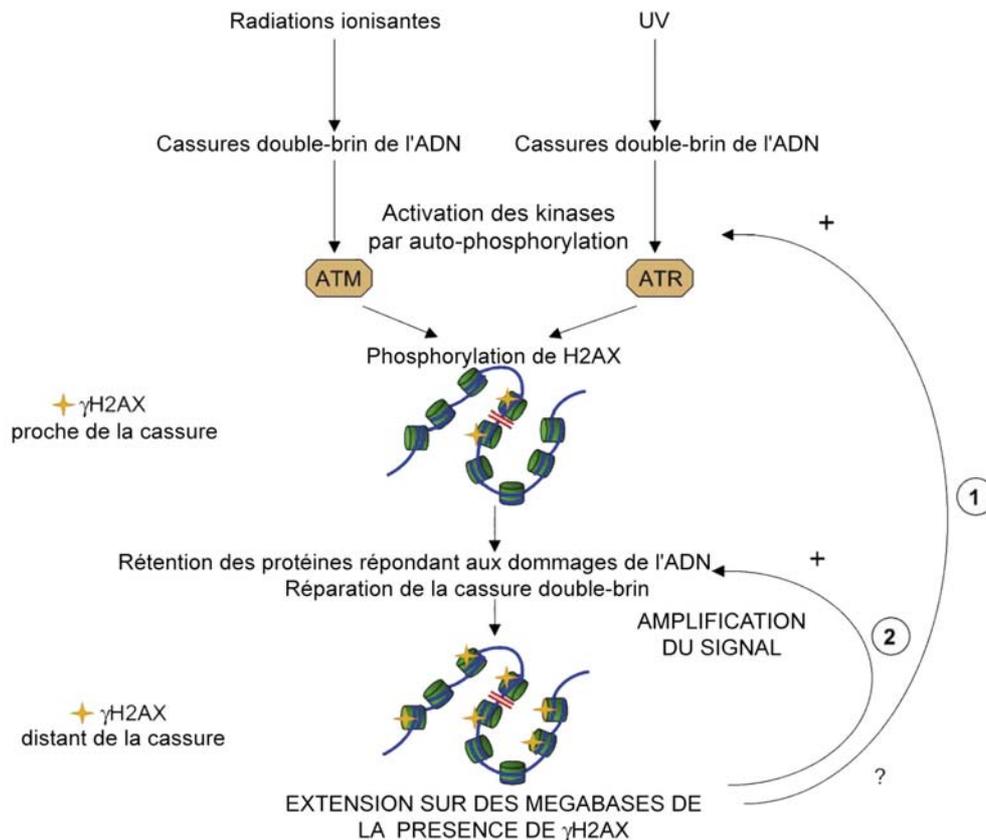


Figure 33 : L'induction de DSBs provoque la phosphorylation de H2AX : amplification du signal, d'après (Koundrioukoff et al., 2004).

Chez les mammifères, H2AX est phosphorylé par ATM et ATR, après exposition aux radiations ionisantes et aux UV, respectivement. La phosphorylation de H2AX est visualisée quelques minutes après induction de DSBs au niveau des sites d'ADN endommagés avant de s'étendre sur des mégabases. On pense que la phosphorylation de H2AX est impliquée dans la rétention des protéines de réparation au niveau des sites endommagés. La présence de domaines H2AX phosphorylé sur des mégabases est susceptible de contrôler d'une manière positive les voies de signalisation conduisant à la réparation des DSBs en amplifiant le signal, mais cela n'a pas encore été démontré.

6.2.4.1.3 – ATM et hTRRAP

La protéine hTRRAP est pourvue comme les ATM de domaines FAT et FATC de fonction inconnue, et d'un domaine PI3 kinase. Toutefois, le domaine kinase de TRRAP est muté et ne peut plus s'autophosphoryler *in vitro*. Par contre, hTRRAP conserve les domaines FAT et FATC qui peuvent être impliqués dans la reconnaissance d'autres protéines.

6.2.4.2 – Le complexe Mre11/Rad50/NBS1 (MRN)

Le complexe Mre11/RAD50/NBS1 joue un rôle majeur dans différents processus cellulaires de la réparation des DSB comme la recombinaison homologue ou le NHEJ, mais aussi dans l'entretien des télomères ou encore dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ce large éventail de fonctions peut s'expliquer par la présence de diverses

activités, enzymatiques ou non, au sein du complexe MRN, qui sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques au sein du complexe MRN

| Activité | Remarques | Références |
|--|--|--|
| Activités nucléolytiques | | |
| Exonucléase 3'-5' | dépendante de l'ATP | Connelly et al. (1999), Hopfner et al. (2001), Paull and Gellert (1998), Trujillo et al. (1998) |
| Exonucléase 5'-3' | uniquement chez gp46/47 du bactériophage T4 | Bleuit et al. (2001), Kreuzer (2000) |
| Endonucléase simple-brin | indépendante de l'ATP | Connelly et al. (1997), Furuse et al. (1998), Hopfner et al. (2000a,b), Trujillo et al. (1998) |
| Ouverture des épingles à cheveux | dépendante de l'ATP | Paull and Gellert (1998), Trujillo and Sung (2001), Connelly et al. (1998), Trujillo and Sung (2001) |
| Rupture de liaison protéine – extrémité de l'ADN | <i>Escherichia coli</i> SbcCD, dépendante de l'ATP | Connelly et al. (2003) |
| Déroulement de l'ADN | dépendante de l'ATP | Paull and Gellert (1999) |
| Ligation d'extrémités d'ADN ou de chromatides sœurs | probablement dépendante de l'ATP | Bressan et al. (1999), Chen et al. (2001), de Jager et al. (2001), Gonzalez-Barrera et al. (2003), Hartsuiker et al. (2003), Hopfner et al. (2002) |
| Coactivateur | | |
| DNA ligase IV | | Chen et al. (2001), Paull and Gellert (2000) |
| <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> (ATM) | | Lee and Paull (2004) |
| <i>Werner syndrome helicase</i> (WRN) | | Cheng et al. (2004) |

Le complexe MRN est doué d'une activité enzymatique un peu particulière, une nucléase stimulée par la présence d'ATP qui dégrade les extrémités d'ADN non-appariées. Les fonctions de ce complexe sont mieux comprises depuis que la structure macromoléculaire de l'hétérotétramère MRE11₂/RAD50₂ a été résolue par microscopie de force atomique (de Jager et al., 2001b). Ce complexe présente une structure bipolaire, avec une tête globulaire formée d'un dimère de MRE11 ainsi que de deux domaines ATPase de RAD50, et de deux longues queues, formées par RAD50. Ces queues, agencées en motif « coiled-coil », permettent la liaison d'extrémités d'ADN et/ou de chromatides sœurs entre elles (Figure 34) (de Jager et al., 2001b).

La structure est ainsi formée d'un hétérotétramère MRE11₂/RAD50₂ et certaines études biochimiques indiquent que NBS1 peut se fixer au niveau de la tête du complexe. NBS1 pourrait se lier à l'hétérotétramère MRE11₂/RAD50₂, sous forme soit monomérique, soit dimérique.

Nous avons vu au paragraphe précédent que, suite à l'induction de DSBs, ATM phosphoryle certaines protéines du complexe MRN telles que NBS1 et MRE11 (Kim et al., 1999) pour activer la réparation des DSBs. Des études précédentes ont montré que le

complexe MRN pourrait intervenir aussi en amont des ATM, conférant au complexe MRN une fonction de détecteur des dommages d'ADN (Lee and Paull, 2005).

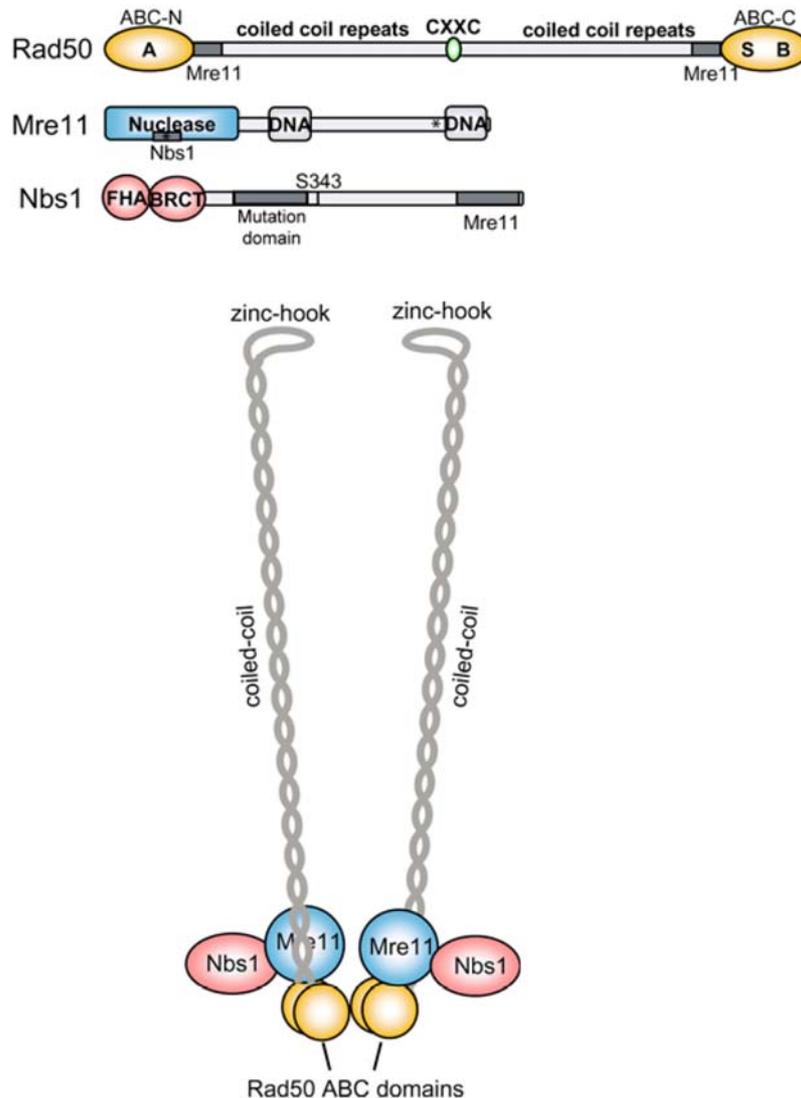


Figure 34 : Domaines fonctionnels et architecture des protéines du complexe MRN, d'après (Assenmacher and Hopfner, 2004).

La structure des domaines et l'architecture de Mre11 et rad50 sont très conservées dans différents organismes. Le domaine ATPase de **Rad50** (orange) comprend un segment en N-terminal (ABC-N), composé d'un motif Walker B (B), et un segment en C-terminal (ABC-C), composés des motifs Walker A (A) et un motif de signature (S). Entre les segment ABC on trouve des domaines « coiled coiled ». La protéine **Mre11** possède un domaine phosphodiesterase à son extrémité N-terminale (bleu) doué d'une activité nucléase et qui constitue un site potentiel d'interaction avec NBS1 (chez les eucaryotes). Au centre, on trouve un domaine de liaison à l'ADN indiqué en gris. Une étoile indique la mutation qui conduit à la maladie ATLD (*Ataxia Telangiectasia-Like Disease*) . La protéine **NBS1** contient un domaine FHA ainsi qu'un domaine BRCT à son extrémité N-terminale. La région C-terminale de NBS1 contient un site potentiel d'interaction avec Mre11. En dessous : architecture du complexe MRN₂. La position de NBS1 n'est pas encore connue.

6.2.4.2.1 – La protéine Mre11

Deux mutations ponctuelles de Mre11, dont une au sein du domaine nucléase, sont caractéristiques du syndrome *ataxia telangiectasia-like*, qui ressemble à la maladie génétique due aux mutations de la kinase ATM (Stewart et al., 1999).

Souvent considérée comme le noyau du complexe Mre11, cette protéine de 75 Kda interagit indépendamment avec NBS1 et RAD50 et peut interagir avec elle-même pour former des dimères ou de larges multimères.

MRE11 est douée de diverses activités enzymatiques. Tout d'abord cette protéine possède une activité exonucléase et coupe les nucléotides dans le sens 3'-5', avec une plus grande efficacité sur les duplex protubérants en 5' ou droits, que sur les protubérants en 3' (Paull and Gellert, 1998). MRE11 est également douée d'une activité endonucléase dépendante de l'ATP, qui permet d'ouvrir les structures en épingle à cheveux. L'activité nucléase de Mre11 est dépendante de la présence d'ATP et elle est à la fois endo et exonucléasique au niveau d'ADN simple-brin, ou bien uniquement exonucléasique au niveau de substrats double-brin (Arthur et al., 2004). Cette protéine n'agit pas seule ; son activité est stimulée par les autres membres du complexe MRN, les protéines Rad50 et NBS1 (Paull and Gellert, 1999).

6.2.4.2.2 – La protéine RAD50

Cette protéine de 150 Kda possède un domaine de liaison à l'ADN très important pour son activité. Des études structurales envisagent que cette protéine lie les extrémités d'ADN de manière à les rapprocher, ce qui faciliterait l'étape ultime de leur religation (de Jager et al., 2001b).

En outre, RAD50 est pourvue d'un domaine qui hydrolyse l'ATP mais ce rôle dans l'activité nucléase 3'-5' n'est pas encore bien établi. Désormais, on considère plutôt que l'hydrolyse de l'ATP contrôle la liaison du complexe MRN à l'ADN (Connelly et al., 2003).

6.2.4.2.3 – La protéine NBS1

Lorsque cette protéine est mutée, dans le cas du « syndrome NBS (*Nijmegen Breakage*) », les patients présentent une instabilité génétique, une hypersensibilité aux agents provoquant des cassures double-brin de l'ADN et un défaut de déclenchement du cycle cellulaire.

NBS1 est composée de trois régions fonctionnelles :

- à son extrémité N-terminale, des domaines FHA (*Forkhead-associated domain*) et BRCT (reconnaissance du domaine C-terminal de BRCA1),
- au niveau de sa région centrale, des motifs SQ, sites consensus de phosphorylation par les kinases ATM et ATR,
- en C-terminal, d'un domaine de liaison à MRE11.

La séquence de cette protéine est peu conservée à travers l'évolution, et donc très faiblement homologue avec celle de Xrs2 chez la levure. Elle est présente en quantité sous-stoechiométrique par rapport aux autres sous-unités du complexe MRN et aucune fonction enzymatique propre n'a pu lui être associée. Par contre, elle peut moduler l'activité nucléase du complexe humain RAD50/MRE11 (Lee et al., 2003a).

NBS1 peut reconnaître H2AX phosphorylée, s'y fixer grâce à son domaine FHA/BRCT, et c'est sans doute ainsi qu'elle permet le recrutement du complexe MRN au niveau des sites de cassure. En revanche, la phosphorylation de NBS1 par les ATM ne semble pas indispensable à son recrutement au niveau des sites de cassure (Kobayashi et al., 2002).

MRE11 peut se relocaliser au niveau des foyers de réparation indépendamment des ATM, ce qui laisse penser que MRE11 détecte les dommages d'ADN avant l'activation par les ATM (Lee and Paull, 2005).

Un modèle suggère que NBS1 détecte les sites endommagés indépendamment des ATM, grâce à sa liaison avec MRE11. Par la suite, les complexes MRN sont maintenus au niveau des sites de cassures en se fixant sur H2AX phosphorylé, ce processus étant, lui, dépendant des ATMs (Kobayashi et al., 2002).

Démonstration a été faite de l'implication de la protéine NBS1 dans le processus de réparation par recombinaison homologue. Les mutants où H2AX est délétée au niveau de son domaine d'interaction avec NBS1, sont déficients dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Celeste et al., 2002). Par contre, l'implication de NBS1 dans la réparation par NHEJ reste controversée. En effet, des tests *in vitro* utilisant un plasmide linéarisé montrent que les mutants déplétés en NBS1 sont toujours capables de réaliser le NHEJ (Tauchi et al., 2002).

6.2.4.2.4 – Implication du complexe MRN dans le processus de NHEJ, discussion

Chez *S.cerevisiae*, Mre11 et Rad50 sont des protéines essentielles pour le DSB *end-joining* (Moore and Haber, 1996), et qui interviennent dans la même cascade d'activation que Ku (Boulton and Jackson, 1996 ; Dudasova et al., 2004; Milne et al., 1996), alors que chez *Schizosaccharomyces pombe*, ces protéines ne semblent pas influencer la réparation des DSBs (Manolis et al., 2001).

Chez les mammifères, l'implication du complexe MRN dans le NHEJ est remise en cause. En effet, des cellules NBS ne sont pas déficientes pour la réparation par NHEJ (Harfst et al., 2000). De plus, l'inactivation de MRE11 dans des cellules DT40 chez le poulet ont indiqué que Mre11 n'est pas épistasique de KU70, composant majeur de la réparation par NHEJ (Yamaguchi-Iwai et al., 1999).

Pourtant, *in vitro*, Ku, DNA-PK et ligase IV/XRCC4 ne sont pas suffisantes pour le NHEJ et le complexe MRN est nécessaire à la réaction de NHEJ (Huang and Dynan, 2002).

Le rôle du complexe MRN dans la réaction par NHEJ n'a pas été clairement établi chez les mammifères et de nouvelles données expérimentales seront nécessaires pour sa confirmation.

6.2.4.2.5 – MRN et le contrôle du cycle cellulaire

Le complexe MRN se fixe directement au niveau de sites de cassure d'ADN, mais il intervient aussi indirectement dans la réparation de l'ADN en contrôlant le cycle cellulaire suite à l'induction de DSBs.

Les cellules mutées au niveau de NBS1 vont par exemple poursuivre leur réplication alors même qu'elles ont subi une irradiation, ce qui indique une déficience au niveau du contrôle pendant la phase S. Dans ces cellules, une réduction de l'induction de p53 et de ses effecteurs en aval a pu être observée (Jongmans et al., 1997). Il en résulte une perte partielle du contrôle en G1/S.

Le complexe MRN est également requis pour la phosphorylation et l'activation de Chk2 en phase G2 après induction de DSBs. Dans les cellules mutées pour NBS1, le défaut d'activation de Chk2 est associé à une incapacité des cellules à entrer en mitose après irradiation. Le point de contrôle G2 est restauré lorsque Nbs1 est réintroduit dans les cellules, mais pas lorsqu'est réintroduit Nbs1 muté au niveau de son site de phosphorylation (Buscemi et al., 2001). Ces études suggèrent que la phosphorylation de Nbs1 par ATM est importante pour le contrôle en phase G2.

Le complexe MRN est encore impliqué dans le point de contrôle pendant la phase S mais n'induit pas la phosphorylation de Chk2 durant cette étape (Falck et al., 2002; Yamaguchi-Iwai et al., 1999).

Ainsi, les complexes MRN sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire après induction de DSBs.

6.2.4.2.6 – Le complexe MRN, conclusion

Le complexe MRN participe directement aux processus de réparation de DSB, par recombinaison homologue ou par NHEJ. L'implication de ce complexe dans divers processus de réparation peut s'expliquer par la capacité de MRN à rapprocher deux extrémités d'ADN entre elles, qu'elles proviennent du brin voisin ou bien de chromatides sœurs. Ce rapprochement de deux brins d'ADN constituerait une étape commune aux processus de NHEJ et de recombinaison homologue.

Après irradiation, le complexe MRN participe indirectement à la réparation par son contrôle des étapes du cycle cellulaire.

6.2.5 – La réparation des cassures double-brin, brève conclusion

Détecteurs de dommages et acteurs de la réparation sont étroitement liés à la régulation du cycle cellulaire. Lorsque le nombre de lésions devient trop important dans les cellules ou que celles-ci sont trop complexes pour être réparées, les cellules sont face à une alternative. Soit poursuivre le processus de réparation au risque d'introduire des mutations, soit arrêter le cycle cellulaire et s'engager dans le processus de mort cellulaire programmée (apoptose).

L'induction de cassures au niveau de l'ADN touche ainsi une grande partie de la machinerie cellulaire : régulation du cycle cellulaire, déclenchement de l'apoptose, modifications de la chromatine, etc... Sans grande surprise, on constate que la réponse cellulaire aux lésions induit un changement de l'expression d'un certain nombre de gènes parmi lesquels les facteurs de réparation, dont un grand nombre est activé.

Les différents processus cellulaires sont tous imbriqués, et, *in vivo*, il devient délicat d'étudier un phénomène cellulaire unique sans perturber les autres.

RESULTATS

Résultats

Partie I

1 – ETUDES FONCTIONNELLES DU COMPLEXE MULTIPROTEIQUE TFTC : TFTC ET P300 COOPERENT POUR ACTIVER LA TRANSCRIPTION

1.1 – Introduction

Suite à la mise en évidence de l'implication de TFTC dans l'initiation de la transcription *in vitro*, sur de l'ADN nu (Wieczorek et al., 1998), nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activation de la transcription par le complexe TFTC dans des systèmes proches de ceux de cellules.

Notre choix s'est porté sur l'utilisation du système d'activation de la transcription par VP16 pour plusieurs raisons. Chez la levure, le complexe SAGA, homologue de TFTC, est capable de se fixer à cet activateur *via* sa sous-unité Tra1, et il coactive la transcription par VP16 (Brown et al., 2001a). TFTC est probablement impliqué dans le même processus. Avant mon arrivée au laboratoire, cette hypothèse avait déjà été testée : Wieczoriek et *al.* avaient démontré *in vitro* que TFTC active la transcription par VP16 sur de l'ADN nu (Wieczorek et al., 1998).

Nous avons alors testé la capacité de TFTC à se lier au domaine d'activation de VP16. En utilisant la chromatographie d'affinité GST-VP16, nous avons détecté une **interaction entre VP16 et le complexe TFTC purifié**. TFTC se lie directement aux deux sous-domaines d'activation de VP16, H1 et H2, alors que le coactivateur **p300** ne se fixe qu'au sous-domaine H2.

Ces études ont été suivies par des études de cotransfection dans des cellules HeLa, où l'on a inhibé d'une part, l'expression de certaines sous-unités de TFTC telles que GCN5 ou que hTRRAP grâce à des vecteurs d'ADN antisens, et d'autre part, l'activité de p300. L'activation de la transcription par GAL4-VP16 est inhibée par une diminution de l'activité de p300 ou par les antisens de hTRRAP ou de hGCN5. L'inhibition conjuguée de p300 et d'une sous-unité de TFTC réduit l'activation de la transcription d'une manière additive, ce qui suggère que **dans un système cellulaire hGCN5 et hTRRAP coopèrent avec p300 pour activer la transcription par GAL4-VP16**.

Enfin, ces résultats ont été confirmés par des expériences de reconstitution de la chromatine *in vitro*. Dans un contexte chromatinien, TFTC seul n'est pas capable d'activer la transcription. Par contre, lorsque le cofacteur p300 est ajouté au système, TFTC retrouve sa capacité à activer la transcription. Ainsi **p300 et TFTC peuvent coopérer pour permettre l'activation par un activateur fort (GAL4-VP16) sur une matrice de chromatine**.

1.2 – La publication

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

Sara Hardy, Marjorie Brand, Gerhard Mittler, Jun Yanagisawa, Shigeaki Kato, Michael Meisterernst, and László Tora.

TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation.

The Journal of biological Chemistry 277, 32875-32882 (2002)

Pages 32875-32882 :

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/277/36/32875.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.

1.3 – Brève conclusion

In vitro, TFTC interagit directement avec les deux domaines d'activation de VP16, H1 et H2, alors que p300 se lie seulement au domaine H2. Ces résultats suggèrent que **TFTC et p300 se fixent indépendamment au niveau de l'activateur VP16**. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent d'une part que p300 lie directement le domaine H2 de VP16 (Ikeda et al., 2002) et d'autre part que le complexe SAGA (homologue de TFTC) lie directement VP16 *via* sa sous-unité Tra1 (Brown et al., 2001b).

Notre étude montre également que **p300 et TFTC coopèrent pour activer la transcription par VP16** dans un système cellulaire (cotransfection) ou bien *in vitro*, dans un contexte chromatinien (chromatine reconstituée). Ainsi deux entités douées d'activité HAT sont requises pour activer pleinement la transcription par VP16 sur certains types de promoteurs. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette nécessaire co-présence de p300 et de TFTC pour activer la transcription par VP16.

1.3.1 – p300 et GCN5 n'ont pas le même profil d'acétylation des histones

Les activités HATs de TFTC et de p300 sont-elles complémentaires ou redondantes? p300 et GCN5 ont chacune une spécificité de substrat distincte, ce qui peut expliquer qu'il y ait besoin des deux enzymes pour activer la transcription.

In vitro, sur une matrice de chromatine reconstituée, TFTC est incapable d'activer la transcription par VP16 en l'absence de p300. Or, p300 n'active la transcription qu'en présence d'acétyl coenzyme A. Ces résultats suggèrent que **l'activité HAT de p300 est nécessaire** avant que celle de GCN5 soit active. Ainsi, les activités HATs de p300 et GCN5 sont plus probablement **complémentaires** que redondantes.

1.3.2 – p300 recrute TFTC

Notre étude a montré qu'*in vitro*, sur une matrice de chromatine reconstituée, TFTC est incapable d'activer la transcription par VP16 en l'absence de p300. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont par ailleurs montré que p300 se fixe très précocément au niveau de promoteurs endogènes, avant TRRAP et GCN5, sous-unités du complexe TFTC (Ait-Si-Ali et al., 1998 ; Yanagisawa et al., 2002). Ainsi sur certains promoteurs, la protéine p300 intervient avant les sous-unités de TFTC pour faciliter l'activation de la transcription. La fonction de p300 est nécessaire à celle de TFTC.

Pour expliquer cette interdépendance fonctionnelle entre p300 et TFTC, on pourrait suggérer que p300 facilite le recrutement du complexe TFTC au niveau du promoteur. Mais p300 et TFTC se lient à VP16 d'une manière indépendante. Ainsi p300 ne facilite probablement pas la liaison de TFTC au niveau de l'activateur VP16.

1.3.3 – p300 crée un contexte structural adéquat à l'action du complexe TFTC

p300 acétyle l'extrémité N-terminale des histones, créant alors un contexte chromatinien favorable à l'initiation de la transcription. p300 peut faciliter l'accès de TFTC à certaines séquences d'ADN au niveau du promoteur. Lorsque p300 acétyle les histones, il est possible que cette modification post-traductionnelle soit reconnue par le bromodomaine de GCN5, ce qui faciliterait le recrutement de TFTC au niveau du promoteur pour activer la transcription.

1.3.4 – p300 acétyle des facteurs de transcription

p300 a la capacité d'acétyle certains activateurs transcriptionnels, ce qui favorise l'activation de la transcription. TFTC pourrait être acétylé par p300 ou se lier à des facteurs acétylés par p300. Cette hypothèse reste entièrement à vérifier.

1.3.5 – p300 et GCN5 interagissent avec des formes différentes de l'ARN polymérase II

L'équipe du Dr Reinberg a montré que p300 interagit avec l'ARN polymérase II non phosphorylée, qui constitue la forme compétente lors de l'initiation de la transcription, tandis que PCAF interagit avec l'ARN polymérase II phosphorylée, qui, elle, est la forme compétente lors de l'élongation (Cho et al., 1998). Cette étude suggère que p300 intervienne dans l'initiation de la transcription, alors que PCAF serait spécifique à l'élongation.

Cet exemple permet de mieux comprendre pourquoi p300 serait requis avant l'intervention d'autres HATs lors de l'activation de la transcription par VP16 sur une matrice de chromatine.

TFTC et p300 coopèrent pour activer la transcription par VP16, mais le mécanisme précis de cette interdépendance n'a pas été élucidé.

Lors d'expériences d'activation de la transcription sur une matrice de chromatine, la présence de p300 est requise pour que la fonction coactivatrice de TFTC puisse s'exercer. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont par ailleurs montré que p300 est susceptible de se fixer précocément, au niveau de certains promoteurs, avant la protéine TRRAP. Ces études ont souligné l'importance de la présence du facteur p300 pour recruter d'autres cofacteurs (TRRAP, GCN5) au niveau de certains promoteurs en vue d'activer la transcription.

Par ailleurs, ces études constituent un exemple tout à fait marquant de la nécessité de recruter différents facteurs d'une manière combinée pour activer la transcription des gènes.

Résultats

Partie II

2 – DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES COFACTEURS AU NIVEAU DE PROMOTEURS ENDOGENES

2.1 – Introduction

Suite au travail qui a mis en évidence la coopération entre p300 et TFTC pour activer la transcription par VP16, nous nous sommes intéressés à la dynamique d'assemblage de ces facteurs au niveau de promoteurs endogènes. Pour répondre à cette question, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été envisagées. Nous avons alors choisi un système répondant à plusieurs exigences :

- la transcription de gènes est induite par des stimuli extérieurs, de manière à étudier la **dynamique** d'assemblage des différents facteurs ;
- **l'intervention de TFTC** dans la transcription de ces gènes est **suspectée**, de manière à augmenter les chances de visualiser certaines sous-unités de TFTC au niveau du promoteur ;
- enfin, nous avons choisi un système d'activation de la transcription déjà caractérisé par diverses équipes, de manière à faciliter la mise en place des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Notre choix s'est porté sur l'étude de la dynamique d'assemblage des facteurs au niveau des promoteurs des gènes pS2 et cathepsine D, dont l'expression est activée par la présence d'œstrogènes.

2.1.1 – Brève introduction sur les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes, facteurs transcriptionnels activés par la présence d'un ligand, sont impliqués dans la croissance et la différenciation de différents tissus. Deux récepteurs aux œstrogènes ont été identifiés chez les mammifères, **ER α** et **ER β** .

Leurs structures modulaires sont caractéristiques de celles de la superfamille des récepteurs nucléaires, et elles comprennent un domaine d'activation de la transcription indépendant de la présence du ligand (le domaine AF-1), un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison du ligand, qui contient une région capable d'activer la transcription en présence du ligand (AF-2), ainsi qu'une région de dimérisation. Le domaine de liaison à l'ADN reconnaît spécifiquement la séquence **ERE** (pour *Estrogen Response Element*), localisée au niveau de la région promotrice des gènes cibles (Robinson-Rechavi et al., 2003). Cette reconnaissance s'effectue dans un contexte chromatinien, d'où la nécessité, comme nous allons le voir, que soient présents des cofacteurs capables de modifier la structure de la chromatine lors de l'activation de la transcription.

Par ailleurs, le récepteur aux œstrogènes α , après liaison de son ligand, subit d'importantes modifications structurales, qui permettent la liaison de cofacteurs transcriptionnels (Brzozowski et al., 1997).

Afin d'activer la transcription de gènes cibles, les récepteurs aux œstrogènes se dimérisent en présence du ligand, puis se fixent au niveau de l'ADN, recrutant alors les coactivateurs, ainsi que les autres facteurs de transcription.

2.1.2 – Quelques coactivateurs du récepteur aux œstrogènes □

Certains coactivateurs bien caractérisés du récepteur aux œstrogènes font partie de la **famille p160/SRC**. Ceux-ci se composent de deux domaines d'activation de la transcription, le domaine AD-1, impliqué dans le recrutement de HATs comme CBP/p300, et le domaine AD-2 impliqué dans le recrutement de la protéine CARM1 (Xu et al., 1999). La capacité de ces protéines à recruter des coactivateurs les classe dans la catégorie des acteurs précoces dans le déroulement de l'activation de la transcription par E₂ (Shang et al., 2000).

Un autre cofacteur, **p300**, se lie à ER uniquement en présence du ligand et participe à l'activation de la transcription en présence d'œstrogènes (Hanstein et al., 1996). Le rôle de p300 dans l'activation de la transcription est dans doute lié à sa capacité à acétyler les histones, puisqu'*in vitro*, sur de l'ADN nu, p300 n'active pas la transcription en présence du ligand E₂. Par contre, sur une matrice de chromatine, p300 active la transcription en présence du ligand E₂, mais uniquement pendant le premier cycle de transcription (Kraus and Kadonaga, 1998). Ces résultats ont été confirmés par la suite par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (Shang et al., 2000). Ainsi **p300** n'interviendrait pas dans le processus de réinitiation de la transcription, mais participerait activement à son **démarrage**.

D'autres cofacteurs participent à l'activation de la transcription par ER, comme le complexe **Médiateur** (Ito et al., 1999b), la protéine **hTRRAP** étudiée ici, ou bien d'autres HATs (**PCAF, GCN5**) (Yanagisawa et al., 2002).

Plusieurs équipes se sont penchées sur le problème de **l'ordre de recrutement de ces cofacteurs** au niveau de promoteurs endogènes, tels que ceux de pS2 et de la cathepsine D : elles ont choisi d'utiliser la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pour résoudre ce problème (Metivier et al., 2003 ; Reid et al., 2003 ; Shang et al., 2000 ; Yanagisawa et al., 2002). L'ensemble de ces travaux a montré que le **récepteur aux œstrogènes** se fixe d'une manière **cyclique** au niveau de ces promoteurs après ajout d'œstrogènes. Les cofacteurs, quant à eux, se fixent selon une séquence bien précise au niveau du promoteur qui sera discutée dans la **partie Résultats/Discussion**.

2.1.3 – TFTC : impliqué dans l'activation de la transcription par les œstrogènes ?

Plusieurs éléments attestent de l'implication du complexe TFTC dans l'activation de la transcription par les œstrogènes.

Tout d'abord, *in vitro*, le récepteur aux œstrogènes est capable de se lier à toute une gamme de facteurs de transcription : TBP, TFIIB (Ing et al., 1992), TAF11 (May et al.,

1996b), TAF10 (Jacq et al., 1994), ADA3 (Benecke et al., 2002; vom Baur et al., 1998), TRRAP et GCN5 (Yanagisawa et al., 2002). Parmi ces protéines, plusieurs sont retrouvées au sein du complexe TFIIIC, comme ADA3, TAF10, GCN5 et TRRAP. Ainsi il est très probable que TFIIIC se lie à ER *in vitro*.

De plus, selon les études menées par Yanagisawa et al., la liaison de sous-unités de TFIIIC telles que GCN5, TRRAP ou bien encore TAF10, au récepteur est dépendante de la présence du ligand E₂ (Yanagisawa et al., 2002). Cependant, certains travaux contredisent cette hypothèse et montrent qu'au contraire, quelques sous-unités de TFIIIC telles que ADA3, GCN5, TAF5L et TAF10 sont déjà présentes au niveau du promoteur avant l'addition d'œstrogènes dans le milieu (Benecke et al., 2002).

Dans un premier temps, nous avons vérifié, grâce à des expériences de transfections transitoires, que certaines sous-unités du complexe TFIIIC, comme GCN5 et TRRAP contribuaient bien à activer la transcription par les œstrogènes *in vivo*.

Puis, après avoir paramétré le système d'activation de la transcription de pS2 par les œstrogènes dans des cellules MCF7, nous avons étudié la dynamique de recrutement de certains facteurs au niveau des promoteurs pS2 et cathepsineD. Les résultats indiquent que les facteurs peuvent se lier au niveau de promoteurs endogènes à des moments différents.

TBP et TRRAP se fixent précocément au niveau des promoteurs cathepsine D et pS2, tandis que la liaison de TAF10 est plus tardive. TAF10 et TRRAP, sous-unités du complexe TFIIIC, se fixent au niveau du promoteur pS2 à des instants différents. De la même manière, TBP et TAF10 n'arrivent pas au niveau du promoteur pS2 au même moment. Ces résultats suggèrent que les protéines d'un même complexe ne sont pas recrutées ensemble au niveau d'un promoteur, mais qu'elles se fixent d'une manière **séquentielle**. Il est possible que les protéines arrivent seules, puis s'assemblent sur le promoteur lui-même pour former des complexes, mais cette hypothèse reste à vérifier.

2.2 – Matériels et méthodes

1 - Transfections

Les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu traité sans œstrogène (Dulbecco-RPMI + 5% FCS T + Genta) pendant 48 heures avant d'être transfectées. Du 17 β -œstradiol est alors ajouté dans ce milieu à une concentration finale de 10⁻⁸ M.

6 X 10⁵ cellules HeLa sont cotransfectées par précipitation au phosphate de calcium dans des boîtes de 9 cm². La quantité totale d'ADN par puits est ajustée à 9 μ g par puits avec un vecteur vide. 1 μ g du vecteur 17M/ERE-Glob-luciférase (Balaguer et al., 2001) est cotransfecté avec 0,5 μ g du vecteur HEO et 1 μ g du vecteur CMV- β gal. Les autres vecteurs sont ajoutés dans les quantités suivantes : 2 μ g de hTRRAP antisens et 2 μ g de E1A 12S (Hardy et al., 2002). Les essais luciférase ont été réalisés avec une quantité identique de protéines et les résultats représentés sont la moyenne de trois transfections indépendantes.

2 - FACs

Les cellules MCF7 sont cultivées dans un milieu traité, sans œstrogène (Dulbecco-RPMI + 10% FCS traité + antibiotiques) pendant 48 heures, puis du 17 β -œstradiol est ajouté à une concentration finale de 10⁻⁷ M. Les

cellules sont ensuite grattées dans du PBS, respectivement 1h, 2h, 5h et 24h après ajout du ligand. Après centrifugation, le culot de cellules est repris dans du PBS, centrifugé à 11 000 rpm, puis repris dans de l'éthanol 70% pendant 30 min. Après 3 lavages dans du PBS, l'ARN est soumis à dégradation (RNase A à 1 mg/ml dans du PBS), puis le culot est repris dans de l'iodure de propidium à 25 µg/ml. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est alors analysée par FACs.

3 - Quantification des ARN messagers

Les cellules MCF7 sont cultivées dans un milieu traité, sans œstrogène (Dulb-RP + 10% FCS traité + antibiotiques) pendant 48 heures, puis E₂ (17β-estradiol dilué dans de l'éthanol) est ajouté à une concentration finale de 10⁻⁷ M. Les cellules sont ensuite grattées dans du PBS 1X, 15 min, 30 min, 60 min, 75 min et 135 min après ajout du ligand. Les cellules sont lavées, puis reprises dans du tampon TNEE (10 mM Tris HCl-pH7,5 ; 50 mM NaCl ; 20 mM EGTA ; 1 mM EDTA). La lyse des cellules est réalisée en ajoutant 5% de glycérol 5 min à 4°C. Après centrifugation 1 minute à 13000 rpm, le surnageant est extrait dans du phénol 2% SDS, puis précipité à l'éthanol. Une RT-PCR à partir de la même concentration en acide nucléique est ensuite réalisée pour amplifier la quantité de matériel récupéré. Enfin, les séquences dans le gène de pS2 ou de GAPDH sont quantifiées grâce à une PCR quantitative (oligonucléotides gène pS2 : 5'-ATC TGC CCG CCT CAG CCT CAG AGA GCT GGG ATT-3' et 5'-TTT GGA GTA GTC AAA GTC AGA GCA GTC AAT-3').

4 - Immunoprécipitation de la chromatine

Les cellules MCF7 sont cultivées dans un milieu traité, sans œstrogène (Dulb-RP + 10% FCS traité + antibiotiques) pendant 48 heures, puis le 17β-estradiol est ajouté à une concentration finale de 10⁻⁷ M. Les cellules sont à 60% de confluence lorsque le ligand est ajouté. 15 min, 30 min, et 60 min après ajout du ligand, les cellules sont fixées dans 1% de formaldéhyde pendant 10 min, puis 2,6 M de glycine sont ajoutés. Les cellules sont alors lavées 3 fois dans PBS 1X/0,5mM PMSF, puis centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min.

Les culots sont ensuite repris dans 5 volumes d'un tampon de lyse (25 mM Hepes, pH 7,8 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,1% NP 40 ; 1 mM DTT ; 0,5 mM PMSF + Protease Inhibitor Tablet) 10 min à 4°C, puis les noyaux sont isolés grâce à un broyeur de tissus manuel Dounce piston B (20 à 30 fois). Après centrifugation 5 min à 5000 rpm, le culot est repris dans le tampon de sonication (50 mM Hepes pH 7,9 ; 140 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1% triton X-100 ; 0,1% Na-deoxycholate ; 0,1% SDS ; 0,5 mM PMSF, Protease Inhibitor Tablet). La sonication est appliquée 9 fois 15 secondes à la puissance maximale, dans de la glace, et ces sonications sont espacées d'une min. Après centrifugation à 14000 rpm pendant 15 min, l'ADN du phage λ soniqué (1 µg/ml) ainsi que la BSA (1 mg/ml) sont ajoutés aux surnageants.

Les immunoprécipitations ont ensuite été réalisées comme suit : les échantillons contenant la chromatine sont tout d'abord préincubés avec la protéine G-sépharose préalablement lavée dans le tampon de sonication. Puis, ces échantillons sont incubés seuls avec les anticorps (1H8 pour TAF10, 3G3 pour TBP, B10 pour le récepteur aux œstrogènes, et un mélange d'1B3 et 2D5 pour TRRAP, anticorps générés à l'institut IGBMC) à 4 °C pendant 2 heures, avant que la protéine G-sépharose soit ajoutée (incubation toute la nuit à 4°C). Les billes G-sépharose sont ensuite lavées dans plusieurs tampons : 2 fois dans le tampon de sonication, 2 fois dans le tampon A (même composition que la tampon de sonication, mais avec 500 mM NaCl), 2 fois dans le tampon B (20 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA ; 250 mM LiCl ; 0,5% NP-40 ; 0,5% Na-déoxycholate ; 0,5 mM PMSF ; + Protease Inhibitor Tablet), puis 2 fois dans du tampon TE (10 mM Tris pH 7,5 ; EDTA 1 mM).

Les billes G sépharose sont alors reprises dans du tampon d'éluion (50 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA ; 1 % SDS). L'éluion des billes à 65 °C pendant 10 min, est réalisée deux fois,. La RNase dépourvue de DNase

est alors additionnée (concentration finale de 25 µg/ ml) et le tout est incubé 5 heures à 65°C. La protéinase K est alors ajoutée à une concentration finale de 50 µg/ ml, puis laissée à incuber 2 heures à 40 °C. L'ADN est ensuite extrait grâce à deux extractions phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis une au chloroforme/alcool isoamylique. Les échantillons sont précipités à l'éthanol, puis lavés, et enfin repris dans du tampon 10 mM Tris pH 7,5.

Des PCR quantitatives sont alors réalisées au Light Cycler (oligo utilisés : promoteur pS2 : 5'-GGC CAT CTC TCA CTA TGA ATC ACT TCT GC-3' et 5'-GGC AGG CTC TGT TTG CTT AAA GAG CG-3', gène pS2 : 5'-ATC TGC CCG CCT CAG CCT CAG AGA GCT GGG ATT-3' et 5'-TTT GGA GTA GTC AAA GTC AGA GCA GTC AAT-3' promoteur cathepsine D : 5'-TCC AGA CAT CCT CTC TGG AA-3' et 5'-GGA GCG GAG GGT CCA TTC-3')

2.3 – Résultats

2.3.1 – hTRRAP et p300 coopèrent pour activer la transcription par ER en présence d'œstrogène

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu vérifier que certaines sous-unités du complexe TFRC sont impliquées dans l'activation de la transcription par les œstrogènes. Dans cette optique, des expériences de cotransfections ont été réalisées dans plusieurs types de cellules, les cellules HeLa ou les cellules COS. Un vecteur codant pour la luciférase et qui comprend un site de liaison aux œstrogènes, est cotransfecté avec le vecteur HEO, qui code pour le récepteur aux œstrogènes. Un vecteur contrôle est cotransfecté en parallèle pour vérifier l'efficacité de transfection.

Les résultats représentés Figure 35 montrent que l'addition d'œstrogènes active la transcription d'un facteur 15 fois. Par contre, lorsque l'expression de la protéine hTRRAP est inhibée à l'aide d'un vecteur TRRAP antisens, l'activation de la transcription s'en trouve affectée et diminue proportionnellement à la quantité de TRRAP antisens ajouté. L'addition de GCN5 antisens provoque le même effet inhibiteur sur l'activation de la transcription par les œstrogènes (résultats non montrés).

Comme diverses équipes l'ont montré, p300 joue certainement un rôle dans l'activation de la transcription par les œstrogènes (Hanstein et al., 1996 ; Kraus and Kadonaga, 1998 ; Shang et al., 2000). Après cotransfection de E1A, qui, comme nous l'avons vu dans la première étude, inhibe l'activité de p300, l'activation de la transcription par les œstrogènes est inhibée ; les résultats d'autres groupes corroborent ce résultat (Figure 35).

De plus, l'expérience met à jour une **inhibition additive** de l'activation de la transcription, dans le cas où l'expression de TRRAP et l'activité de E1A sont inhibées. Ces données suggèrent donc que TRRAP et p300 sont conjointement requis pour activer la transcription par les œstrogènes.

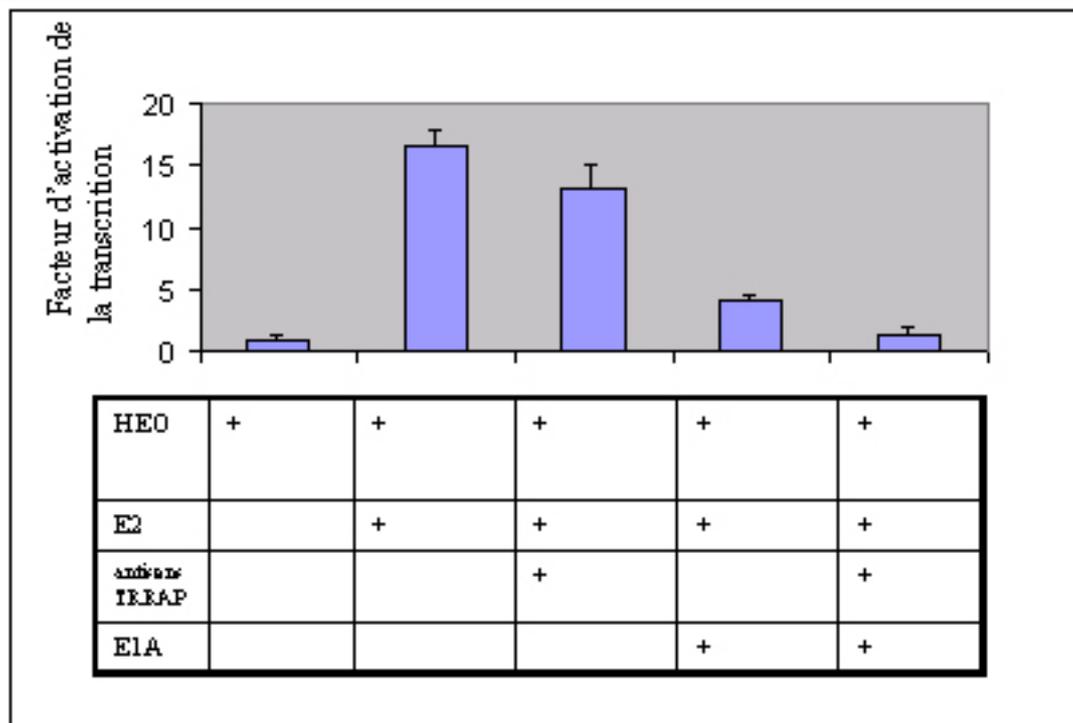


Figure 35 : TRRAP et p300 sont conjointement requis pour activer la transcription par les récepteurs aux œstrogènes.

Expérience de cotransfection dans des cellules HeLa : 1 µg 17M/ERE-Glob-luciférase ; 0,5 µg du vecteur HEO ; 1 µg du vecteur CMV-βgal ; 2 µg de hTRRAP antisens ; 2 µg de E1A 12S sont transfectés par puit de 9 cm de diamètre. Les essais luciférase ont été réalisés avec une quantité identique de protéines et les résultats montrés représentent la moyenne de trois transfections indépendantes.

2.3.2 – Quantification de l'expression du gène pS2 dans les cellules MCF7 après induction par E2

Après avoir vérifié que hTRRAP et GCN5 jouent un rôle dans l'activation de la transcription par les récepteurs aux œstrogènes en présence de ligand, nous avons voulu connaître l'ordre d'arrivée de ces facteurs au niveau du promoteur endogène pS2. Pour ce faire, nous avons commencé par vérifier que l'ajout d'œstrogènes provoque l'activation de la transcription du gène endogène pS2. Les cellules de cancer du sein MCF7, qui réagissent à la présence d'œstrogènes dans le milieu, ont été utilisées pour cette étude. Celles-ci ont tout été d'abord cultivées 48 h dans un milieu traité et sans rouge de phénol (dépouvé d'œstrogènes et d'autres molécules qui peuvent activer ERα). Dans ce milieu, les cellules cessent de se diviser (Figure 36B).

D'une part, lorsque le ligand E2 est ajouté au milieu, la capacité des cellules à entrer en mitose est restaurée (entre 5h et 24h)(Figure 36B).

D'autre part, l'addition de E2 conduit à l'activation de la transcription du gène pS2 et à l'accumulation de son ARN messager dans les cellules (Figure 36A). L'augmentation de l'expression du gène pS2 n'est pas simultanée dès l'ajout du ligand, et n'est observée qu'une heure après l'ajout du ligand. Ce délai peut s'expliquer par l'intervalle de temps nécessaire

pour transcrire le gène et a été observé par d'autres groupes (Burakov et al., 2002; Shang et al., 2000).

Le système utilisé permet l'activation de la transcription de pS2 par les récepteurs aux œstrogènes et paraît donc adéquat pour l'étude de l'assemblage des cofacteurs au niveau du promoteur pS2.

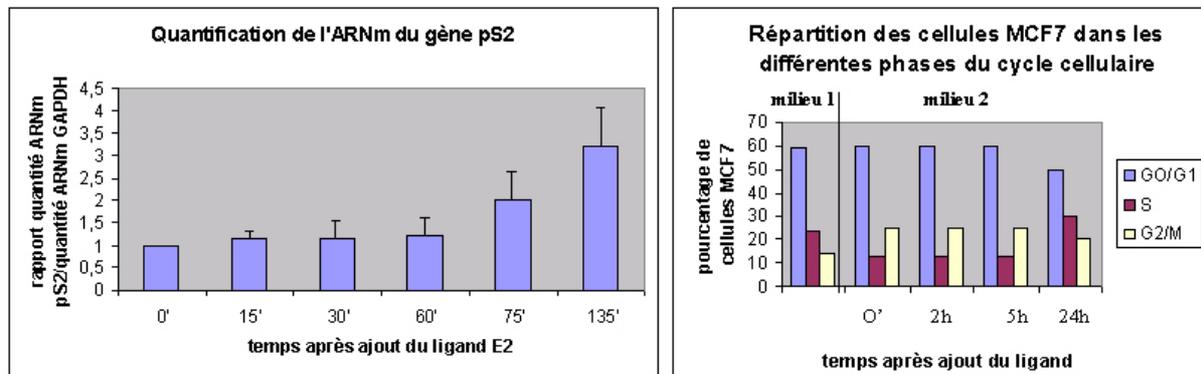


Figure 36 : La transcription du gène pS2 est activée par les œstrogènes dans les cellules MCF7

A – Quantification de l'ARNm de pS2 après extraction des ARNm totaux des cellules MCF7, RT-PCR, puis PCR quantitative. La quantité d'ARNm pS2 est rapportée à celle de l'ARNm de GAPDH à différents temps après ajout du ligand. Les résultats représentent la moyenne de deux duplicats.

B – Répartition des cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction du milieu dans lequel elles sont cultivées.

La composition du milieu 2 est Dulb sans rouge de phénol + 10% FCS traité + antibiotiques, tandis que celle du milieu 1 est Dulb avec rouge de phénol + 10% FCS non traité + antibiotiques.

2.3.3 – Dynamique d'assemblage des cofacteurs au niveau des promoteurs endogènes de pS2 et de la cathepsine D

La dynamique d'assemblage des protéines ER, TRRAP, TBP et TAF10 au niveau des promoteurs de pS2 et de la cathepsine D a ensuite été étudiée.

Le récepteur aux œstrogènes est recruté d'un facteur 10 fois au niveau du promoteur pS2, 15 minutes après ajout de ligand. A cet instant, les protéines TRRAP et TBP sont également présentes sur le promoteur pS2 (Figure 37A).

TBP continue à être visualisée 30 min et 60 min après ajout du ligand, tandis que TRRAP ne l'est plus à 60 min.

La protéine TAF10, quant à elle, arrive plus tardivement au niveau du promoteur.

Les résultats concernant la dynamique de recrutement de ces facteurs au niveau du promoteur de la cathepsine D sont comparables à ceux concernant le promoteur de pS2, mais la cinétique de fixation des facteurs semble plus rapide au niveau du promoteur de la cathepsine D (Figure 37B). Cependant, si le recrutement se fait de manière cyclique, nous manquons de points dans cette expérience pour évaluer la fréquence.

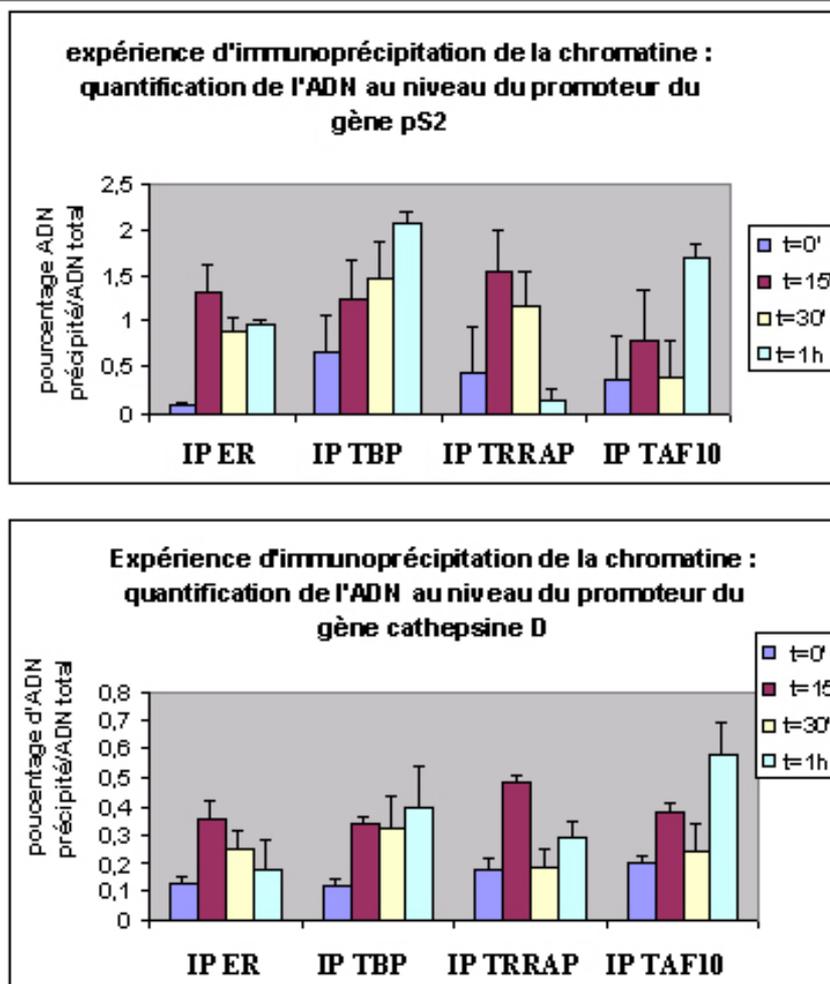


Figure 37 : Dynamique d'assemblage des facteurs ER, TBP, TAF10 et TRRAP au niveau des promoteurs endogènes de pS2 et de la cathepsine D

Les cellules ont été fixées à différents temps après ajout du ligand, 15 min, 30 min, et une heure. Les immunoprécipitations de la chromatine ont été réalisées avec les anticorps B10 pour ER, 1H8 pour TAF10, 3G3 pour TBP et un mélange d'1B3 et 2D5 pour TRRAP. Ces résultats représentent la moyenne des quantifications de deux préparations de chromatine différentes.

2.4 – Discussion

Les résultats obtenus par immunoprécipitation de la chromatine révèlent que des protéines retrouvées au sein d'un même complexe sont recrutées à différents moments au niveau du promoteur. Cette mise en évidence est très intéressante pour concevoir le fonctionnement de complexes multiprotéiques *in vivo*, et nous donne une vision très **dynamique de ces complexes**.

Cependant, les données ci-dessus ne permettent pas vraiment d'aboutir à la construction d'un modèle d'assemblage des cofacteurs de ER au niveau du promoteur. Le mode d'assemblage des cofacteurs de ER est un sujet très controversé. Certains groupes proposent un **assemblage séquentiel**, dans lequel les cofacteurs ne se fixeraient pas d'une manière simultanée au niveau du promoteur (Burakov et al., 2002). D'autres suggèrent que les

cofacteurs s'assemblent au niveau du promoteur de manière **combinatoire** (Shang et al., 2000).

Les résultats obtenus ici grâce aux expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ne prétendent pas à la construction d'un modèle. Pourtant, ils fournissent des indices très intéressants qui seront maintenant discutés.

Tout d'abord, cette étude montre que la majeure partie de TAF10 se fixe tardivement au promoteur pS2, alors que TBP s'y fixe précocément. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat :

- TBP arrive seul et recrute par la suite les TAFs pour former TFIID. C'est cette hypothèse a été retenue par Métivier et *al.*, qui ont visualisé TAF1 et TAF4 se fixant sur le promoteur de pS2 après TBP (Metivier et al., 2003);
- Les TAFs ne sont recrutées que tardivement pour réinitier la transcription, comme cela a été suggéré par Oelgeschlager et *al.* (Oelgeschlager et al., 1998).

Dans un deuxième temps, nous avons observé que la majeure partie de TAF10 se fixe tardivement au promoteur pS2, alors que TRRAP ne s'y fixe que précocément. Ainsi TRRAP et TAF10 ne sont pas visualisés ensemble au niveau du promoteur pS2. TFTC complet n'a pas été visualisé au niveau du promoteur. Nous pouvons imaginer que :

- TFTC, sans TAF10, se fixe précocément. Cette hypothèse constituerait une preuve supplémentaire de la modularité des complexes. Cependant, elle est peu vraisemblable, car d'autres sous-unités de TFTC, telles que GCN5 ou encore TAF4, ont été visualisées plus tardivement, par une autre équipe (Metivier et al., 2003).
- TRRAP est recruté seul. Il a été montré dans d'autres études que TRRAP peut se lier seul au niveau du promoteur pour permettre par la suite le recrutement d'enzymes douées d'activité HAT (McMahon et al., 2000 ; Memedula and Belmont, 2003). Cette observation rejoint le rôle de tremplin de TRRAP dans le recrutement de différentes activités HATs, et concorde particulièrement bien avec la mise en évidence de la fixation plus tardive de GCN5 (Metivier et al., 2003).
- TRRAP est recruté au sein de complexes protéiques distincts de TFTC. De multiples complexes protéiques intègrent la protéine hTRRAP, comme nous le verrons **dans la partie III résultats**. Cette hypothèse est très probable, car la fixation de TRRAP concorde avec celle de la protéine TIP60 (Metivier et al., 2003). Pour la vérifier, une élégante approche serait la double chromatine immunoprécipitation. Le matériel immunoprécipité avec TRRAP sera soumis à une deuxième immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre des interagants de TRRAP. Nous pourrions ainsi savoir si TRRAP se lie précocément au promoteur seul, ou accompagné de TIP60, ou d'autres partenaires.

Ces hypothèses offrent chacune un éclairage intéressant et nous avons commencé, par purifier les complexes dont TRRAP fait partie (**partie III résultats**).

Ces résultats montrent que TRRAP et TBP ne se fixent pas forcément en même temps que TAF10. Or, TRRAP et TBP sont des sous-unités spécifiques au complexe TFTC et TFIID respectivement, tandis que TAF10 est partagée par les deux complexes. Nous avons suggéré au cours de cette thèse que les TAFs partagées par les deux complexes TFTC et TFIID puissent s'assembler en un module ou sous complexe de protéines. Cette hypothèse a été partiellement testée par la caractérisation d'un sous complexe de TAFs (immunodéplétion d'un extrait en TBP et en TRRAP, résultats non montrés), mais elle réclame de plus amples investigations.

Comme l'ont montré divers groupes, p300 arrive précocément au niveau du promoteur pS2 ou celui de la cathepsine D (Metivier et al., 2003; Shang et al., 2000; Yanagisawa et al., 2002). Ainsi Yanagisawa et al. montrent que p300 se fixe avant TRRAP et GCN5 sur le promoteur cathepsine D, et Métivier et al. visualise p300 avant GCN5 et TAF4. L'ensemble de ces résultats suggère que p300 se lie avant les sous-unités du complexe TFTC au niveau de promoteur activé par la présence d'œstrogènes.

Notre première étude montre que p300 et TFTC coopèrent pour activer la transcription par VP16, et que sur une matrice de chromatine, l'activité de p300 est requise pour que TFTC active la transcription. Dans le système d'activation de la transcription par les œstrogènes, *in vivo*, p300 est recruté en premier lieu, avant les sous-unité du complexe TFTC. Ainsi dans deux systèmes d'études différents, p300 intervient précocément pour activer la transcription, avant TFTC. Shang et al. ont suggérés que p300 intervienne uniquement dans l'initiation de la transcription (et pas dans la réinitiation).

Si les fonctions de divers HATs sont redondantes *in vitro*, il est possible qu'*in vivo*, les HATs interviennent à différents moments dans l'activation de la transcription. Cette explication concorde bien avec les résultats obtenus par transfection transitoire, où les protéines GCN5 et p300 sont toutes deux requises pour l'obtention d'une activation maximale de la transcription.

Comme nous l'avons vu, ces expériences de ChIP soulèvent de nombreuses questions.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats attestent de la **modularité des complexes** et de la **dynamique d'assemblage** des cofacteurs très complexe au niveau d'un promoteur. L'utilisation systématique de RNAi en conjonction avec les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine est une perspective séduisante qui permettra de déterminer la spécificité relative ou la redondance des cofacteurs dans le recrutement des cofacteurs.

Résultats

Partie III

3 – ISOLEMENT DES COMPLEXES CONTENANT LA PROTEINE HTRRAP : MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION ENTRE HTRRAP ET LES COMPLEXES MRE11/NBS1/RAD50

3.1 – Introduction

Nombreuses sont les preuves de l'implication de la protéine TRRAP dans l'activation de la transcription, comme nous l'avons vu partie I et II des résultats. Cependant, la fonction précise de TRRAP n'est toujours pas connue. Membre de la famille des PIKK, TRRAP a néanmoins subi des mutations qui l'incapacitent à phosphoryler.

TRRAP est probablement capable de véhiculer des activités HATs (TIP60, GCN5) pour activer la transcription. Toutefois, la fonction de TRRAP comme plateforme d'interaction protéique a été peu analysée, et attribuée par défaut, puisqu'aucune autre fonction propre n'a pu lui être découverte. Notre but dans cette troisième étude a été de trouver de **nouvelles pistes fonctionnelles** sur la protéine **TRRAP**.

D'autre part, nous avons vu dans la partie II résultats que TRRAP, sous-unité de TFIIIC, se fixe sans TAF10 au niveau du promoteur pS2. Se pose alors la question de savoir si TRRAP se lie seul ou au sein d'autres complexes de protéines à ce moment au niveau du promoteur. Pour envisager cette question, il faut au préalable avoir connaissance de l'ensemble des complexes que TRRAP peut intégrer. Lors de cette troisième étude, nous voulons isoler **l'ensemble des complexes qui contiennent la protéine TRRAP**. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Flavie Robert au laboratoire.

Ainsi, j'ai focalisé mon travail de thèse sur l'étude de la fonction de la protéine hTRRAP, et pour trouver des pistes fonctionnelles quant à **hTRRAP**, nous avons choisi d'**identifier de nouveaux partenaires de cette protéine**. Nous avons entrepris de purifier l'ensemble des complexes liés à la protéine hTRRAP par double immunoprécipitation.

Une immunoprécipitation (IP) a tout d'abord été réalisée à l'aide d'anticorps hTRRAP. L'éluat de cette IP est par la suite déplété en hTAF10. Le surnageant de la deuxième IP contient donc les interactants de hTRRAP, excepté les sous-unités du complexe TFIIIC. L'analyse de cette fraction par spectrométrie de masse MALDI-TOF a révélé la présence de partenaires de la protéine hTRRAP déjà connus. Puis, nous avons identifié des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN jusqu'ici jamais isolées en interaction avec hTRRAP, comme les protéines MRE11, RAD50 et NBS1 qui forment un complexe (MRN) impliqué dans la réparation des cassures doubles brins. Nous avons alors vérifié la spécificité de cette interaction en réalisant des immunoprécipitations avec des lavages de plus en plus stringents et en réalisant une immunoprécipitation inverse à l'aide d'un anticorps NBS1 ou MRE11, confirmant l'existence d'une **interaction entre les complexes MRE11/RAD50/NBS1 et hTRRAP**.

Les complexes MRN jouent un rôle dans un processus particulier de réparation de l'ADN, dit de « non-homologous end joining »(NHEJ).

Après la mise en évidence de l'interaction hTRRAP/complexes MRN, on s'est demandé si les activités HAT liées à hTRRAP jouent un rôle dans la réparation de l'ADN en améliorant l'accessibilité de l'ADN au niveau des sites de cassures.

La capacité des co-immunoprécipitants de MRE11 et de NBS1 à acétyler les histones a été évaluée. **Aucune activité HAT n'a pu être détectée avec le complexe de réparation MRN** associé à hTRRAP, suggérant que hTRRAP n'est pas capable d'apporter des protéines douées d'activité HAT au niveau du complexe MRN.

Nous avons alors testé la capacité d'extraits déplétés en TRRAP à réaliser une réaction de NHEJ *in vitro*. Les résultats montrent que **l'inhibition de hTRRAP entraîne *in vitro* une diminution de l'activité « end-joining »**.

Nous avons ensuite testé l'implication de la protéine hTRRAP dans le NHEJ *in vivo*. Pour cela, nous avons évalué la capacité de circularisation d'un plasmide linéaire transfecté dans des cellules HeLa lorsque l'expression de la protéine hTRRAP est inhibée. Les résultats montrent une diminution de la circularisation des plasmides lorsque l'expression de hTRRAP est inhibée dans des cellules, indiquant **l'implication de la protéine hTRRAP dans le processus de « end joining » *in vivo***.

En résumé, ces études ont montré que la protéine hTRRAP s'associe de façon stable avec le complexe MRN, et est impliquée dans le processus de réparation des cassures double brin d'ADN par NHEJ.

3.2 – La publication soumise à MCB

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

Flavie Robert, **Sara Hardy**, Zita Nagy, Céline Baldeyron, Rabih Murr, Ugo Déry,
Jean-Yves Masson, Dora Papadopoulo, Zdenko Herceg and Lászlo Tora

The transcriptional HAT cofactor TRRAP associates with the MRN repair complex and plays a role in DNA double strand break repair.

Soumis à Molecular and Cellular Biology

La prepublication présentée ici dans la thèse est disponible dans la version papier de la thèse

Il est possible de la consulter 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.

3.3 – Conclusion

Précédentes études suggèrent que TIP60 est impliqué dans la réparation des DSBs. Son domaine HAT est tout d'abord requis pour un niveau de réparation maximal (Ikura et al., 2000), et son activité HAT permettrait d'échanger le dimère γ H2AX-H2B en un dimère H2A-H2B non modifié (Kusch et al., 2004). Suite à ces études, on peut proposer que TRRAP joue un rôle dans la réparation en tant qu'accompagnateur de l'HAT TIP60. Cependant, aucune donnée ne sont disponibles sur la fonction de TRRAP au côté des HATs dans la réparation (contrairement à la transcription), et finalement aucune fonction de TRRAP dans la réparation n'a jusqu'alors été mise en évidence.

Notre étude a mis à jour une fonction nouvelle pour TRRAP dans la réparation de l'ADN par le processus dit de NHEJ. Pour la première fois, nous avons isolé la protéine hTRRAP en compagnie d'un acteur central de la réparation des DSBs, le complexe MRN. De plus, nous avons démontré que hTRRAP intervient directement dans le processus de NHEJ, sans qu'aucune activité HAT lié au complexe MRN n'ait été détectée.

En conclusion, les résultats présentés dans ce papier démontrent que TRRAP peut directement être impliqué dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par le processus de NHEJ.

Résultats

Partie IV

4 – MISE EN EVIDENCE D'UNE NOUVELLE SOUS-UNITE DU COMPLEXE TFTC : ATAXIN 7

4.1 – Introduction

Pendant ma thèse, j'ai également travaillé en collaboration avec Dominique Helmlinger et Didier Devys du laboratoire du Pr J.L Mandel.

La fonction de la protéine ATXN7 n'est pas connue. Par contre, on sait que lorsque son gène *SCA7* comprend une expansion de CAG dans sa séquence codante, cela conduit à une protéine ATXN7 avec une expansion de polyglutamine, responsable du développement d'une maladie neurodégénérative héréditaire : l'ataxie spino-cérébelleuse de type 7. Cette maladie se caractérise par une dégénérescence progressive du cervelet, du tronc cérébral et des voies spinocérébelleuses, associées à une dégénérescence maculaire pigmentaire et une perte progressive de l'acuité visuelle. Plus le nombre de CAG est important dans la séquence du gène, plus le phénotype observé est sévère.

A l'institut, une équipe de génétique travaille sur cette maladie et a généré des souris transgéniques exprimant soit ATXN7 normale (10Q : R7N), soit ATXN7 mutée (90Q : R7E) spécifiquement dans les photorécepteurs de type bâtonnets (Dominique Helmlinger, Didier Devys, laboratoire J.L.Mandel).

4.1.1 – Publication 1 : ataxine 7 au sein du complexe TFTC

Chez la levure, un homologue de la protéine ataxine-7 (SGF73) a été identifié comme sous-unité du complexe SAGA. Ma contribution dans ce travail a été :

- de vérifier par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps contre ATXN7 ou hTRRAP que les sous-unités de TFTC et ATXN7 co-immunoprécipitent dans des extraits de cellules HeLa.
- de déterminer le profil d'activité HAT des coimmunoprécipitants de ATXN7. Celui-ci est comparable à celui du complexe de type TFTC, preuve supplémentaire de la présence d'ATXN7 dans TFTC.

4.1.2 – Publication 2 (en cours de préparation) : l'expansion polyglutamine provoque une désorganisation complète de la chromatine

Le groupe de Didier Devys a par la suite mis en évidence une désorganisation de la structure de la chromatine dans les photorécepteurs des souris R7E, et notamment une décondensation de la chromatine.

Comme la protéine ATXN7 fait partie du complexe TFTC doué d'activité HAT, nous avons voulu savoir si cette désorganisation peut être due à un changement de l'activité HAT liée au complexe de type TFTC.

Ma contribution a alors été de réaliser des tests HATs *in vitro*, avec comme substrat les histones libres ou agencés en nucléosomes, sur du matériel immunoprécipité avec hTRRAP,

ATXN7 ou SPT3 (trois sous-unités du complexe TF7C) à partir de rétine de souris R7E ou R7N. Aucune modification globale au niveau de l'acétylation n'a pu être observée entre des souris R7E et R7N.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont ensuite été menées pour tester une éventuelle différence d'acétylation des histones au niveau de certains promoteurs. Les résultats montrent que le recrutement de TF7C ainsi que l'acétylation au niveau de promoteurs sont modifiés dans les rétines de souris R7E. De plus, la modification observée est une augmentation de l'acétylation au niveau de promoteurs de gènes sous-exprimés dans les rétines mutées, en concordance avec l'observation d'une structure chromatiniennne décondensée.

4.2 – Publication 1

4.3 – Publication 2

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

Dominique Helmlinger, **Sara Hardy**, Souphatta Sasorith, Fabrice Klein, Flavie Robert, Chantal Weber, Laurent Miguet, Noëlle Potier, Alain Van-Dorsselaer, Jean-Marie Wurtz, Jean-Louis Mandel, Lászlò Tora and Didier Devys

Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes.

Human Molecular Genetics 13, 1257-1265 (2004)

Pages 1257-1265 :

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://hmg.oxfordjournals.org/cgi/reprint/13/12/1257.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.

Aberrant Recruitment of TFTC-type Complex Containing Polyglutamine-expanded Ataxin-7 Mediates Chromatin Decondensation and Photoreceptor Dysfunction in Spinocerebellar Ataxia Type 7

Dominique Helmlinger^{1,§}, Sara Hardy^{2#}, Greta Abou-Sleymane^{1,6#}, Adrien Eberlin², Aaron B. Bowman⁴, Anne Gansmüller³, Serge Picaud⁵, Huda Y. Zoghbi⁴, Yvon Trottier^{1,6}, László Tora^{2,*} and Didier Devys^{1,2,*}

¹Department of Molecular Pathology,

²Department of Transcription,

³Imaging Technology Platform,

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, CU de Strasbourg, France.

⁴Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Human Genetics, and Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030

⁵Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, INSERM U-592, UPMC, Paris, France

⁶Chaire de Génétique Humaine, Collège de France

equally contributed to this report

* Correspondence

Didier DEVYS: devys@igbmc.u-strasbg.fr

Laszlo TORA: laszlo@igbmc.u-strasbg.fr

§ Present address: Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Keywords: polyglutamine, ataxin-7, transcription, chromatin, retina

Running title: TFTC-type complex deregulation in rods from SCA7 mice

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is one of several inherited neurodegenerative disorders caused by a polyglutamine (polyQ) expansion but is the only one in which the retina is affected. Increasing evidence suggests that transcriptional alterations contribute to polyQ pathogenesis, although the mechanism is unclear. We previously demonstrated that the SCA7 gene product, ataxin-7 (ATXN7), is a subunit of the GCN5 histone acetyltransferase (HAT) containing coactivator complexes TFIIIC/STAGA. We describe here a set of events accounting for SCA7 pathogenesis in the retina. We find that polyQ-expanded ATXN7 induced a progressive and dramatic decondensation of chromatin territories in rod photoreceptor nuclei from SCA7 mouse models. Chromatin decompaction resulted from an aberrant recruitment of TFIIIC/STAGA HAT complexes to specific promoters and consequent histone H3 hyperacetylation. Surprisingly, hyperacetylated genes were transcriptionally inactive. These modifications disrupted the rod-specific expression profile through down-regulation of nearly all genes highly expressed in rods, leading to rod dysfunction and visual impairment SCA7 mice. Our finding that polyQ-expanded ATXN7 deregulated HAT complex recruitment, leading to chromatin and transcriptional alterations provides new and unexpected insights into SCA7 pathogenesis.

INTRODUCTION

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by expansion of an unstable CAG trinucleotide repeat encoding a polyglutamine (polyQ) stretch (David et al. 1997; Michalik et al. 2004). The expansion of a translated CAG repeat causes eight other progressive neurodegenerative diseases, including Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy, dentatorubral and pallidoluysian atrophy and other spinocerebellar ataxias – SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, and SCA17 (Cummings and Zoghbi 2000). Expanded polyQ confers a toxic gain of function to otherwise unrelated proteins. Aggregation of expanded polyQ-containing proteins in the nucleus is a hallmark of these diseases. Despite these common properties, polyQ diseases also show distinctive features, which may reflect the unique protein context of the polyQ expansion in each disease. SCA7 can be distinguished from other polyQ diseases, as it is the only one affecting the retina leading to visual impairment and eventually to blindness (Enevoldson et al. 1994).

We recently demonstrated that ataxin-7 (ATXN7), the protein mutated in SCA7, is a bona fide subunit of the TATA-binding protein (TBP)-free TAF-containing complex (TFTC) and the SPT3/TAF9/GCN5 acetyltransferase complex (STAGA) (Helmlinger et al. 2004b). These transcriptional co-activator complexes were shown to preferentially acetylate histone H3 in both free and nucleosomal contexts and to activate transcription on chromatin templates (Martinez et al. 1998; Brand et al. 1999; Hardy et al. 2002). TFTC/STAGA complexes contain the GCN5 histone acetyltransferase, TRRAP, SPT, ADA proteins and a subset of TBP-associated factors (TAFs), but clearly lack TBP (Carrozza et al. 2003). In contrast, the general transcription factor TFIID contains TBP and 14 TAFs, some of which are shared with TFTC/STAGA. TFTC/STAGA complexes are the mammalian homologues of the yeast Spt/Ada/Gcn5 (SAGA) complex (Grant et al. 1997; Martinez 2002). Genome-wide expression

studies indicated that transcriptional regulation of approximately 10% of the yeast genome is predominantly regulated by SAGA and 90% by TFIID. Most SAGA-dominated genes were found stress inducible and highly regulated while TFIID controlled the expression of housekeeping genes (Huisinga and Pugh 2004). In comparison with yeast SAGA, the mechanisms by which mammalian TFIIIC-like complexes regulate RNA Pol II transcription remain elusive.

Early and severe transcriptional alterations were detected in various polyQ models (Sugars and Rubinsztein 2003). Expanded polyQ-containing proteins have been proposed to interfere with the normal function of several transcription factors, notably by sequestering them to nuclear inclusions (NIs), but the exact mechanisms leading to transcriptional deregulation remain largely unknown. The mouse retina is a suitable neuronal tissue to perform transcriptional studies as rods represent more than 97% of photoreceptors and more than 70% of all retinal cells (Jeon et al. 1998). In wild-type mice, the nuclei of rod photoreceptors display a very peculiar organization different from that of any other retinal neurons, with a thin rim of euchromatin surrounding a large heterochromatin territory (Carter-Dawson and LaVail 1979). Chromatin plays a pivotal role in regulating transcription, suggesting that rod nuclear organization specifies its gene expression profile. In particular, genes encoding components of the phototransduction cascade are expressed specifically in rods, at remarkably high levels due to constant renewal of rod outer segments.

We previously generated transgenic mice specifically expressing normal (10Q) or mutant (90Q) ATXN7 in rod photoreceptors (hereafter called R7N and R7E lines, respectively) (Yvert et al. 2000). Mutant ATXN7 induced a progressive loss of segments and dramatic reduction of rod electrophysiological activity in R7E mice. Segment loss paralleled a progressive and severe down-regulation of rhodopsin (*Rho*), which was the earliest molecular anomaly detectable in these mice (Helmlinger et al. 2004a). Similar observations were made

in a SCA7 knock-in mouse model, which expresses mutant ATXN7 at endogenous levels (Yoo et al. 2003), suggesting that loss of photoreceptor specific gene expression is relevant to SCA7 retinopathy.

We discovered that, in the retina from SCA7 mice, mutant TFIIIC/STAGA HAT complexes induced histone H3 hyperacetylation through their aberrant recruitment to promoters of rod photoreceptor-specific genes. Furthermore, rod nuclei showed chromatin decondensation which, surprisingly, correlated with severe transcriptional repression of the corresponding genes. Expression analysis revealed that most genes whose expression is normally high and restricted to rods were affected, presumably due to alteration of rod highly organized nuclear architecture. Finally, loss of expression of most genes required for phototransduction provides a molecular explanation for the retinal degeneration observed in SCA7 mice.

RESULTS

Severe alteration of rod photoreceptor nuclear architecture in SCA7 mice

R7E mice, which express mutant (90Q) ATXN7 under control of the rhodopsin promoter, have a normal life span due to restricted transgene expression in rod photoreceptors. This allowed us to show that mutant ATXN7-induced retinopathy is characterized by long-term and complete dysfunction of rods (Helmlinger et al. 2004a). We have now investigated more thoroughly the ultrastructural changes accompanying prolonged rod dysfunction by electron microscopy of wild type, R7N and R7E retina at different ages. We noticed that a progressive loss of outer segments in R7E mice occurred despite a normal retinal epithelium appearance (Figure S1) indicating that rod photoreceptors have a defect in segment renewal.

The most surprising abnormality was a striking modification of rod nuclear architecture. In wild-type mice, rods have small nuclei (4-5 μm diameter) with a characteristic polyhedral shape and contain a single, large clump of heterochromatin surrounded by a sparse rim of euchromatin (Figure 1C, panels a, d). R7N rod photoreceptors were indistinguishable from those of wild type mice (Figure 1A, panel a), consistent with the absence of phenotype in this line (Yvert et al. 2000; Helmlinger et al. 2004a). In marked contrast, rods from R7E mice showed a dramatic chromatin decondensation, associated with a massive increase in nuclear volume (Figure 1A, panels b, c). Consequently, rod nuclei from R7E mice showed much more euchromatin and resembled cone nuclei or that of neurons from the inner nuclear layer (INL). However, these abnormal photoreceptors were undoubtedly identified as rods because a fibrillar structure was observed in the decondensed chromatin territory (arrows in Figure 1A, panels b, c), which likely corresponded to aggregated mutant ATXN7. Immunofluorescence staining confirmed the presence of a single nuclear inclusion in weakly DAPI-stained territories in rods from aged R7E mice (Figure S2). This aberrant chromatin alteration was a progressive phenomenon as it was already observable in 2 month-old R7E mice, although less

prominent and heterogeneous (Figure 1B, panel b). At 2 years of age, almost all nuclei were larger and rounder and the spacing between nuclei was greater than in wild-type retina (Figure 1B, panel c).

Comparable chromatin remodeling in rods from SCA7 knock in mice

We then tested whether this nuclear phenotype was relevant to SCA7 retinopathy or due to overexpression of mutant ATXN7 in R7E mice. We performed electron microscopy of retina from 3 month-old SCA7 heterozygous knock-in mice ($Sca7^{266Q/5Q}$) which present a retinopathy, comparable to that occurring in R7E animals (Yoo et al. 2003). Rod nuclear architecture was altered in $Sca7^{266Q/5Q}$ mice when compared to wild-type littermates (Figure 1C). Rod nuclei from $Sca7^{266Q/5Q}$ mice contained more euchromatin and displayed a reduced and disorganized heterochromatin territory (compare panels b, c, e, f with panels a, d in Figure 1C). We could observe a small, pale fibrillar structure in the decondensed chromatin territory (Figure S3), which likely resulted from aggregation of mutant ATXN7 into NIs. Although comparable, chromatin decondensation appeared less severe in heterozygous $Sca7^{266Q/5Q}$ animals than in age-matched R7E mice. Premature death of $Sca7^{266Q/5Q}$ mice precluded analysis of the extent of chromatin remodeling at later stages, when the nuclear phenotype was prominent in R7E mice. These data together show that significant chromatin alterations occurred in rod nuclei of both SCA7 transgenic and knock-in mouse models further suggesting that this aberrant nuclear phenotype is relevant to polyQ-expanded ATXN7-induced retinopathy.

Aberrant rod chromatin remodeling is correlated with rod dysfunction

In early stages of the R7E retinal phenotype (at 2 months), different degrees of chromatin decondensation were observed by electron microscopy (Figure 1B). At this age, histological

examination of toluidin-blue stained retinal sections revealed patchy zones of chromatin decondensation throughout the retina (Figure 2A). Strikingly, normal condensed rod nuclei were always connected with preserved inner and outer segments, while areas with abnormal decondensed rod nuclei were associated with segment thinning (Figure 2A). Interestingly, areas with remaining segments were occasionally found associated with slightly decondensed nuclei, while areas without any segments left were never associated with normal condensed nuclei. This latter observation suggested that the observed aberrant chromatin decondensation might be a primary event preceding the loss of segments and rod dysfunction.

In order to examine whether transcriptional dysregulation of *Rho* occurred in rods undergoing chromatin decondensation, we performed immunohistology using an anti-rhodopsin antibody. This revealed a striking patchy down-regulation of *Rho* expression in 2 month-old R7E mice (Figure 2B). Immunofluorescence showed that nuclei of rhodopsin-negative rods always displayed severe chromatin decondensation (Figure 2C and arrowheads in Figure 2D), while nuclei from immunopositive rods had a preserved chromatin architecture (Figure 2C and arrows in Figure 2D). Thus, the 10% residual *Rho* mRNA levels detected by RT-PCR (Figure 3C) at 2 months of age are likely due to a small proportion of rods with preserved chromatin structure, while abnormal rods have completely silenced rhodopsin expression. Altogether these results demonstrate that polyQ-expanded ATXN7 induces a dramatic chromatin alteration that correlates with extinction of *Rho* expression.

Reduced mRNA levels of rod-specific genes in SCA7 mice

Activation of transcription is usually associated with chromatin decondensation. However, we found that *Rho* down-regulation correlated with chromatin decondensation. We thus tested at which extent such an important change in chromatin organization would affect the gene expression profile of rod photoreceptors. As in aged R7E mice rod nuclear architecture was

similar to that normally seen in cone photoreceptors (Figure 1B), we analyzed expression levels of transcription factors specifically expressed and involved in rod *versus* cone fate specification. *Nrl*, a basic motif-leucine zipper transcription activator and *Crx*, a homeobox transcription activator are both essential for rod and cone differentiation by controlling photoreceptor gene expression (Chen et al. 1997; Furukawa et al. 1997; Mitton et al. 2000; Mears et al. 2001). We also determined the expression levels of the orphan nuclear receptor *Nr2e3*, a marker of early rod differentiation (Kobayashi et al. 1999; Haider et al. 2001). Quantitative RT-PCR revealed decreased mRNA levels of *Crx* (2-fold, 55% residual mRNA levels), *Nrl* (3-fold, 31%) and *Nr2e3* (5-fold, 21%) in 2 month-old R7E retina (Figure 3A), suggesting an alteration of photoreceptor differentiation in adult R7E mice. In order to further assess a potential trans-differentiation of rods into cones, we quantified mRNA levels of genes encoding cone- or rod-specific markers. However, we did not observe a consistent up-regulation of genes encoding components of cone phototransduction cascade. In 2 month-old R7E mice, blue cone opsin (*Bcp*) and cone arrestin (*Carr*) were down-regulated (43% and 65% residual levels, respectively), while cone transducin (*Gnat2*) was up-regulated by 113% (Figure 3B).

Importantly however, we found a severe down-regulation of most rod-specific genes tested (12 out of 13). In 2 month-old R7E mice, quantitative RT-PCR showed a down-regulation of rhodopsin (*Rho*, 13% residual mRNA levels), rod transducin (*Gnat1*, 3%), rod phosphodiesterase β -subunit (*Pde6b*, 10%), rhodopsin kinase (*Rhok*, 28%), Rom-1 (*Rom*, 23%) and Irbp (*Rbp3*, 52%) (Figure 3C and Supplemental Table 1). Moreover, using Northern blot experiments, we observed comparable reduction of other rod-specific gene mRNA levels (Table 1), namely phosducin (*Pdc*), rod cGMP-gated channel (*Cnng*), rod arrestin (*Sag*), guanylate cyclase activator (*Guca*), recoverin (*Rcvrn*) and peripherin 2 (*Prph2*). Five distinct

housekeeping genes (*Ppia*, *Gapd*, *Arbp*, *Tuba1* and *Hprt*) showed no differential expression between R7E and WT mice (see figure legends and data not shown).

Finally, we extended our analysis of transcriptional deregulation to the level of the whole transcriptome. Hybridization of MOE 430A Affymetrix microarrays that contained ~22,000 mouse transcripts, using total RNA extracted from WT, R7N and R7E at 2 months of age, revealed that polyQ-expanded ATXN7 does not induce a global alteration of mRNA levels, as less than 1% of genes were deregulated with a 2-fold threshold ($p \leq 0.015$, Mann-Whitney test) (G. Abou-Sleymane and Y. Trottier, manuscript in preparation). Importantly, when down-regulated genes were classified according to their expression levels in control retina, 29 of the 50 most highly expressed genes are specifically expressed in the retina. This latter observation showed that polyQ-expanded ATXN7 preferentially down-regulated genes with a retina-restricted expression pattern. Finally, we did not find up-regulation of genes encoding factors regulating chromatin structure or accessibility.

Down-regulated rod-specific genes in SCA7 mice are transcriptionally altered

As chromatin decondensation has been typically associated with active transcription, we tested whether the decreased mRNA levels of rod-specific genes were indeed due to a reduced transcriptional activity of these genes. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments using formaldehyde cross-linked chromatin extracts prepared from 2 month-old control (CT: WT or R7N) and R7E retina. We used an antibody raised against the C-terminal domain (CTD) of the largest subunit of RNA Pol II in ChIP experiments to quantify the relative RNA Pol II occupancy at promoters and coding regions of down-regulated genes. Immunoprecipitated or input DNA amounts were quantified by real-time PCR using primers covering promoter regions from five rod specific genes (*Rho*, *Pde6b*, *Rbp3*, *Crx* and *Nrl*) and from a ubiquitously expressed gene, nucleolin (*Ncl*).

All down-regulated genes analyzed showed reduction of RNA Pol II occupancy at the corresponding promoter regions (Figure 4A-E). Furthermore, RNA Pol II recruitment at the *Rho* enhancer region (Nie et al. 1996), at the coding sequence (exon 4) and at the 3'UTR of *Rho*, was strongly reduced in R7E mice (Figure 4A). No differences were detected in the coding region of a house-keeping gene, encoding nucleolin (*Ncl*) (Figure 4F). Thus, the observed reduction of rod specific mRNA levels resulted from decreased transcriptional activity of these genes.

In conclusion, mutant ATXN7 induces a severe and specific down-regulation of genes, which are normally highly and specifically expressed in rods, accounting for the previously observed visual impairment of SCA7 mice (Yoo et al. 2003; Helmlinger et al. 2004a). Together with *Nrl* and *Crx* down-regulation, this aberrant expression profile suggests that rods from R7E mice have completely lost their differentiated state, but did not trans-differentiate into mature cone photoreceptors.

Specific compartmentalization of expressed genes in rod photoreceptor nuclei

Surprisingly, the severe chromatin decondensation in R7E retina did not induce a global alteration of the rod transcriptome, but rather a specific defect in expression of a small subset of genes. We hypothesized that highly expressed genes would localize to peripheral euchromatin in normal rods and that this specific compartmentalization would be disrupted by the chromatin alterations that occur in rods from SCA7 mice. Immunostaining of WT retina using antibodies against transcription factors (ATXN7, RNA Pol. II, TBP, TAF10, *Crx* and *CBP*) and chromatin associated proteins (*HP1 γ* , *HMG1(Y)*, *Rb1*, acetyl-histone H3) revealed that these proteins were always excluded from the heterochromatic region, showing a characteristic ring-like appearance (Figure S4, and see (Zhang et al. 2004)).

We used interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) of mouse retina sections to investigate the nuclear localization of the gene encoding rhodopsin (*Rho*) versus a gene not expressed in rods, the vascular smooth muscle alpha-actin gene (*Acta2*). BAC probe specificity was confirmed by hybridization of metaphase chromosome spreads from mouse ES cells (Figure S5). *Rho* and *Acta2* probes were hybridized to retinal sections from 2 month-old WT and R7E mice, and each revealed one or two specific spots in virtually all nuclei. Confocal analysis revealed that the *Rho* gene was almost never found inside the central, densely DAPI-stained heterochromatin territory in WT rod nuclei (Figure 5A and 5B). In contrast, the *Acta2* gene could be reproducibly detected within heterochromatin (arrowheads in Figure 5D and 5E). Quantitative estimates of heterochromatin localization clearly differentiated the location of the *Acta2* and *Rho* genes, showing $15.1 \pm 2.8\%$ and $2.4 \pm 1.1\%$ signals centrally located, respectively (Figure 5G).

This highly specific distribution was strikingly altered in rod nuclei from 2 month-old mice (Figure 5C and 5F). Indeed, *Rho* gene could be detected also in the densely DAPI-stained area (arrowheads in Figure 5C) and now displayed a nuclear distribution identical to that of *Acta2* gene (Figure 5G). Altogether, these results suggested that the rod nuclear organization normally compartmentalizes rod specific genes in peripheral euchromatin. However, in R7E mice, the alteration of chromatin structure and of this compartmentalization presumably contributes to alterations of the rod gene expression profile.

Polyglutamine expanded ATXN7 incorporation in TFTC/STAGA complexes does not modify their histone acetyl transferase activity

The discrepancy between chromatin and transcriptional abnormalities in R7E mice prompted us to analyze the effect of the polyQ expansion in ATXN7 on the TFTC histone acetyltransferase (HAT) complex composition and activity. We previously reported that both

normal and mutant ATXN7 can incorporate into TFTC using transfected HEK293T (Helmlinger et al. 2004b). We have now extended this result by analyzing TFTC-type complexes purified from the retina of R7N and R7E transgenic animals, where the pathology normally appears in SCA7 patients. Co-immunoprecipitation experiments were performed using whole retinal extracts from 4 week-old mice, an age at which mutant ATXN7 is soluble and has not yet been proteolytically processed (Yvert et al. 2000). First an anti-ATXN7 immunoprecipitation (IP) using R7N or R7E mice retinal extracts, retrieved *bona fide* TFTC subunits, such as Gcn5, Trrap and Taf10 together with normal or polyQ-expanded ATXN7 (Figure 6A, and data not shown). Reciprocally, when anti-TRRAP or anti-SPT3 antibodies were used, normal and mutant ATXN7 were equally incorporated into the Trrap- and Spt3-containing complexes (Figure 6B-C). We also tested whether the presence of mutant ATXN7 changed the incorporation of the histone acetylase subunit Gcn5. TFTC complexes prepared by an anti-ATXN7 or an anti-TRRAP IP from R7N and R7E mice contained about equal levels of Gcn5 and Trrap, as shown by western blot analysis of immunopurified fractions (Figure 6A and 6D). Importantly, Gcn5 incorporation was not altered even in 10 week-old mice (Figure 6D), an age at which severe chromatin changes were observed.

Next we tested whether the above-purified HAT complexes containing either normal or mutant ATXN7 (Figure 6A-D) acetylate free or nucleosomal histones in an *in vitro* acetylation test. TFTC-type complexes purified by an anti-AXN7 IP from the retina of R7N mice have the expected HAT activity, since they acetylate mainly histone H3 and weakly H4 as does the highly purified TFTC (Figure 6E and see (Brand et al. 1999)). Histone acetylation pattern of complexes immunopurified from R7N or R7E retina were indistinguishable (Figure 6E). When Spt3- or Trrap-containing complexes were tested for their acetylation activity we did not observe a significant difference between complexes purified from retina of R7N or R7E mice at either 4 or 10 weeks of age (Figure 6F and G). We have also carried out the tests

with nucleosomal histones and obtained no significant differences between the HAT activities of complexes prepared from either R7N or R7E mice (Figure S6). These data together suggest that polyQ-expanded ATXN7 does not significantly alter the *in vitro* HAT activity of TFTC-type complexes.

The presence of mutant ATXN7 in the TFTC/STAGA complexes induces an aberrant TFTC recruitment to promoters of rod specifically expressed genes

As mutant ATXN7 does not impair TFTC histone acetyltransferase activity *in vitro*, we next tested whether the abnormal chromatin remodeling could result from a deregulation of TFTC recruitment at specific promoters in rods from SCA7 mice *in vivo*. We performed ChIP experiments using chromatin extracts prepared from 2 month-old control (CT: WT or R7N) and R7E retina to quantify TFTC recruitment at promoter regions from genes down-regulated (*Rho*, *Pde6b*, *Rbp3*, *Crx* and *Nrl*) or unmodified (*Ncl*) in R7E mice.

To monitor TFTC recruitment we used an antibody raised against SPT3 (Brand et al. 2001) a bona fide subunit of TFTC/STAGA-type complexes. We found a specific increase (2-3 fold) of Spt3 occupancy at the promoters from the *Rho*, *Pde6b* and *Rbp3* genes in R7E mice, as compared to control mice (Figure 7A). In contrast, Spt3 recruitment was not modified at the *Crx* and *Nrl* promoters (Figure 7B). Similarly, the housekeeping gene *Ncl* did not show any differences in Spt3 binding (Figure 7B). We next analyzed whether this abnormal recruitment of TFTC-type complexes causes elevated levels of histone modifications at promoters of deregulated genes, possibly accounting for the transcriptional alterations observed in R7E mice. As TFTC preferentially acetylates lysines on the N-terminal tail of histone H3, we quantified H3 K9 and K14 acetylation at the promoter regions previously analyzed. We found an aberrant histone H3 hyperacetylation profile in R7E mice that perfectly paralleled aberrant TFTC recruitment. *Rho*, *Pde6b* and *Rbp3* promoter regions were hyperacetylated in R7E mice

as compared to control mice (Figure 7C). When comparing the ChIP signals obtained at the Rho, Pde6b and Rbp3 promoters, we observed around a 2- to 3-fold increase both in histone H3 acetylation and in Spt3/TFTC occupancy between R7E and control mice. In contrast, H3 acetylation pattern at promoters from Crx, Nrl and Ncl was not modified in R7E mice as compared to control mice (Figure 7D). Taken together, these results strongly suggest that the polyQ expansion in ATXN7 does not modify its incorporation into TFTC, but rather induces a deregulation of TFTC function leading to histone H3 hyperacetylation at specific promoters and, unexpectedly, leads to the downregulation of retinal specific genes (see Discussion).

DISCUSSION

Based on our findings, we propose that mutant ATXN7, by its incorporation in TFTC-type complexes, deregulates TFTC recruitment at specific promoters, thereby inducing aberrant histone H3 acetylation patterns. Alterations of chromatin-modifying complex regulation might result in a severe disorganization of the normal chromatin condensation pattern seen specifically in mature rod photoreceptor nuclei. Deciphering the exact causal relationships between these events will require further investigations. Regardless, these perturbations altogether eventually cause a loss of the tissue-specific pattern of gene expression, leading to rod photoreceptor dedifferentiation and dysfunction.

Chromatin decondensation leads to transcriptional repression of rod specific genes in SCA7 mouse retina

We provide here the first evidence that polyQ expansions induce chromatin structure changes *in vivo*, contributing to early neuronal dysfunction. Taking advantage of the mosaic progression of the R7E retinal phenotype, we showed that rhodopsin down-regulation and hence rod dysfunction were completely correlated with chromatin decondensation. This nuclear phenotype appeared to be a primary event in SCA7 retinopathy as it was already detected at early stages of the disease, preceding segment loss. Candidate gene expression and transcriptome analysis of R7E retina revealed a specific down-regulation of rod-specific genes. Similarly, Yoo *et al.* reported that five of these genes were affected in Sca7^{266Q/5Q} animals (Yoo et al. 2003). Thus, comparable chromatin and transcriptional abnormalities were observed in both transgenic and knock-in models, suggesting that these observations are relevant for SCA7 retinopathy. The observations we made for SCA7 in the retina may be relevant to polyQ toxicity in other neuronal types in other disease models. Identification of the

mechanisms underlying specific transcriptional alterations observed in other polyQ diseases (Luthi-Carter et al. 2000; Luthi-Carter et al. 2002) will help design therapeutic strategies.

Contribution of chromatin organization to rod specific expression profile

Numerous studies have suggested that changes in nuclear organization establish specific patterns of gene expression, in particular during differentiation (Francastel et al. 2000; Spector and Gasser 2003; Casolari et al. 2004; Janicki et al. 2004). Chromatin condensation in rods is tightly regulated as it accompanies rod terminal differentiation and may thus be required for proper regulation of cell type-specific and stage-specific expression in the mouse retina (Neophytou et al. 1997) (D. Helmlinger and D. Devys, unpublished observations). A recent study suggested a correlation between rod chromatin re-organization and a specific transcriptional repression of rod-specific genes in mice (Zhang et al. 2004). Together with our observations in R7E mice, this suggests that rod specific chromatin condensation is required to reach high expression levels for a specific set of genes encoding proteins required for rod differentiation and function. Our FISH results indicate that a non-expressed gene will be localized in the densely stained central chromatin region, whereas a rod expressed gene, such as *Rho*, will be localized in the peripheral euchromatin. In agreement with this highly regulated nuclear architecture, disruption of this specific compartmentalization in the retina of R7E mice resulted in a random distribution of both expressed and non-expressed genes. These findings might explain, at least in part, why such a massive chromatin remodeling in SCA7 mice only affected the expression of a subset of genes, presumably those whose expression and nuclear distribution are the most tightly regulated.

Although rod central chromatin displayed histological properties of heterochromatin, it might also contain housekeeping genes with lower expression levels. At present the composition of this large clump of heterochromatin in rod photoreceptors seems to be unknown. Rod nuclei

might contain chromatin-associated factors, such as specific histone variants, which could be restricted to mature rods and necessary to regulate the expression of genes involved in rod differentiation and activity. Such proteins were already identified and shown to be required for various developmental processes or during induction/silencing of gene expression (Cai et al. 2003; Cammas et al. 2004). Positioning highly expressed genes in the rod nuclear periphery might also be used to accelerate the coupling between mRNA synthesis and its processing and export, thereby boosting the total rate of protein synthesis (Ishii et al. 2002; Vinciguerra and Stutz 2004).

Involvement of TFTC-type complexes in rod transcriptional regulation

We have identified three distinct types of transcriptionally regulated genes in SCA7 mice: (i) those whose expression is not changing despite severe chromatin reorganization, (ii) those showing an increased TFTC binding, histone H3 hyperacetylation and transcriptional decreases (i.e. *Rho*, *Pde6b* and *Rbp3*) and (iii) those without any difference in histone H3 acetylation and TFTC recruitment, but with transcriptional alterations (i.e. *Nrl* and *Crx*). Genes belonging in the first category are probably weakly transcribed and thus are not sensitive to the changes in nuclear environment. In contrast, as *Rho*, *Pde6b* and *Rbp3* belong to the category of genes which have to be highly transcribed in rod photoreceptors, we hypothesize that at the promoters of these genes TFTC requirement is normally highly regulated and aberrant TFTC recruitment causes deregulated Pol II transcription. In addition, these genes may be particularly sensitive to the changes occurring in the chromatin territories. The third category of genes would only be sensitive to the global changes in the chromatin and might not be directly regulated by TFTC-type complexes.

It has been suggested that the photoreceptor-specific transcriptional activator *Crx* may play a role in SCA7 retinopathy by direct interaction with ATXN7 (La Spada et al. 2001; Chen et al.

2004b). A recent study showed that both normal and polyQ-expanded ataxin-7 are able to incorporate into TFTC/STAGA, confirming our *in vivo* findings in mouse retina (Palhan et al. 2005). This study also suggested that TFTC/STAGA complexes might act as coactivators for Crx-mediated transcriptional activity and that mutant ATXN7 inhibits TFTC/STAGA coactivator complexes HAT activity *in vitro*. However, our results do not support this hypothesis, since we do not detect any changes in HAT activity in TFTC/STAGA complexes purified from mouse retinal extracts, at an age when dramatic chromatin and transcriptional abnormalities were observed. We were also unable to detect any direct interaction between ATXN7-containing TFTC/STAGA complexes and Crx in wild type mouse retina by co-immunoprecipitation experiments (Figure S7). Finally, ChIP experiments in our mouse model revealed an increased Spt3 occupancy and concomitant histone H3 hyperacetylation at promoters from genes showing decreased RNA Pol II occupancy and loss of expression. Thus, our results do not provide evidence supporting the hypothesis that SCA7 retinopathy is primarily due to interference with Crx function through inhibition of TFTC/STAGA HAT activity.

Chromatin opening and histone H3 hyperacetylation at several rod-specific genes, normally considered as positive signals for transcription, markedly contrasted with transcriptional down-regulation of a number of genes in R7E retina, as shown by reduced mRNA levels and decreased RNA Pol II occupancy. Supporting this observation, Bowman et al. reported in *Sca7^{266Q/5Q}* mice increased UbG76V-GFP transgene mRNA levels in rods showing loss of rhodopsin staining (Bowman et al. 2005). Several non-exclusive hypotheses can be proposed to explain how polyQ-expanded ATXN7 containing TFTC can be aberrantly recruited at certain promoters and how this would down-regulate gene expression. One possibility would be that the presence of the polyQ stretch within TFTC serves as an aberrant interaction domain with the chromatin, recruiting TFTC at aberrant sites, causing chromatin

decondensation and displacing transcriptional co-activators from their normal localization. Supporting this possibility, large-scale chromatin decondensation has been observed after targeting most acidic activators to heterochromatin domains (Chen et al. 2004a; Carpenter et al. 2005). It will also be interesting to analyze potential modifications of the structural organization of polyQ-containing TFTC complexes. Supporting this possibility, a recent study showed that ATXN7 yeast orthologue, Sgf73, was necessary for SAGA integrity and that re-incorporation of polyQ-expanded ATXN7 modified SAGA subunit composition and HAT activity in yeast (McMahon et al. 2005). Alternatively, mutant ATXN7 might alter some events downstream of co-activator recruitment. Indeed, increased occupancy of TFTC-type complexes did not lead to increased transcription, supporting that additional factors are required to assemble and activate RNA Pol II transcription machinery at rod-specific genes. Finally, mutant TFTC-type complexes may aberrantly acetylate non-histone substrates accounting for chromatin decondensation and transcriptional alterations observed in SCA7 mice. Hyperacetylation of HMG proteins or that of histone H1, which was shown to be very efficiently acetylated by TFTC *in vitro* (Brand et al. 1999), may be other good candidates. HMGI(Y) plays a crucial role for rhodopsin promoter activity (Chau et al. 2000) and has been shown to be acetylated by PCAF/GCN5 (Munshi et al. 2001).

Altogether these future directions may provide new insights into SCA7 pathogenesis but also into the transcriptional mechanisms initiating and controlling a tissue-specific gene expression pattern and the contribution of TFTC-type coactivator complexes to such processes *in vivo*.

MATERIALS and METHODS

Animals

R7N and R7E animals were from the R7N.C and R7E.A transgenic lines, respectively, and were maintained on the inbred C57BL/6 background (Yvert et al. 2000). The Sca7266Q/5Q/C1 line was backcrossed with C57Bl/6J (Yoo et al. 2003). Genotyping was performed using PCR on mouse tail genomic DNA according to procedures described previously (Yvert et al. 2000; Yoo et al. 2003). All experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Quantitative RT-PCR analysis of retinal RNA

We prepared total RNA by single-step extraction of guanidium thiocyanate retinal homogenates. Reverse transcription was performed on 1 µg total RNA using SuperScriptII (Invitrogen, Carlsbad, CA) and random hexamers according to the manufacturer instructions. PCR amplifications of cDNA were performed using SYBR Green I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) on a LightCycler instrument (Roche Products, Basel, Switzerland). PCR primers were designed using Primer3 software and are available upon request.

Immunoprecipitation and histone acetylation assay

Extracts from two retina are immunoprecipitated using 50 µl of A-Sepharose beads and polyclonal antibodies (anti-TRRAP, 1930, as described (Helmlinger et al. 2004b) and anti-ATXN7 1261 or monoclonal antibodies for SPT3. After washing IP, beads are immediately boiled and processed for western blot analysis or used for a HAT assay. The HAT test was performed on free histones or on nucleosomes as described (Brand et al. 1999). A list of used antibodies is available in Supplemental data.

Electron microscopy, histology and immunohistology, Fluorescence in situ hybridization and Chromatin immunoprecipitation

See Supplemental data.

Supplemental data

Supplemental data include 2 Tables; Supplemental Experimental Procedures; Supplemental References, available in document S1 and eight figures available in document S2.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J.L. Mandel, M. Frontini, T. Hussenet and S. DuManoir for helpful discussions and advice with CHIP and FISH experiments and to F. Winston for critically reading the manuscript. We thank R. Losson, X. Zhu, C. Craft, D. Hicks and G. Manfioletti for providing antibodies. We also thank F. Landmann, C. Weber staff from the Institut Clinique de la Souris for their contribution to this work.

This work was supported by funds from INSERM, CNRS, Hôpital Universitaire de Strasbourg and Collège de France; ARC, FRM, the Fonds National de La Science ACI, European Community RTN (HPRN-CT-2000-00087, HPRN-CT-2000-00088 and HPRN-CT-2004-504228), STREP (LSHG-CT-2004-502950) and AICR (03-084) grants (to LT.); Hereditary Disease Foundation (U.S.A.) and European Community (EUROSCA integrated project, LSHM-CT-2004-503304) grant (to D.D. and Y.T.).

REFERENCES

- Bowman, A.B., Yoo, S.Y., Dantuma, N.P., and Zoghbi, H.Y. 2005. Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet* **14**: 679-91.
- 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**: 3187-96.
- Brand, M., Yamamoto, K., Staub, A., and Tora, L. 1999. Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J Biol Chem* **274**: 18285-9.
- Cai, S., Han, H.J., and Kohwi-Shigematsu, T. 2003. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet* **34**: 42-51.
- Cammass, F., Herzog, M., Lerouge, T., Chambon, P., and Losson, R. 2004. Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* **18**: 2147-60.
- Carpenter, A.E., Memedula, S., Plutz, M.J., and Belmont, A.S. 2005. Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* **25**: 958-68.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Cote, J. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321-9.
- Carter-Dawson, L.D. and LaVail, M.M. 1979. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* **188**: 245-62.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**: 427-39.
- Chen, D., Belmont, A.S., and Huang, S. 2004a. Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15106-11.
- Chen, S., Peng, G.H., Wang, X., Smith, A.C., Grote, S.K., Sopher, B.L., and La Spada, A.R. 2004b. Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization. *Hum Mol Genet* **13**: 53-67.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Zack, D.J. 1997. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**: 1017-30.
- Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y. 2000. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* **9**: 909-16.
- David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., Drabkin, H., Gemmill, R., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J.L., and Brice, A. 1997. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.* **17**: 65-70.
- Enevoldson, T.P., Sanders, M.D., and Harding, A.E. 1994. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families. *Brain* **117**: 445-60.
- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I., and Groudine, M. 2000. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 137-43.

- Furukawa, T., Morrow, E.M., and Cepko, C.L. 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**: 531-41.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L., and Workman, J.L. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**: 1640-50.
- Haider, N.B., Naggert, J.K., and Nishina, P.M. 2001. Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. *Hum Mol Genet* **10**: 1619-26.
- 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**: 32875-82.
- Helmlinger, D., Abou-Sleymane, G., Yvert, G., Rousseau, S., Weber, C., Trottier, Y., Mandel, J.L., and Devys, D. 2004a. Disease progression despite early loss of polyglutamine protein expression in SCA7 mouse model. *J Neurosci* **24**: 1881-7.
- Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., Klein, F., Robert, F., Weber, C., Miguet, L., Potier, N., Van-Dorselaer, A., Wurtz, J.M., Mandel, J.L., Tora, L., and Devys, D. 2004b. Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet* **13**: 1257-65.
- Huisinga, K.L. and Pugh, B.F. 2004. A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **13**: 573-85.
- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., and Laemmli, U.K. 2002. Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* **109**: 551-62.
- Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H., and Spector, D.L. 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* **116**: 683-98.
- Jeon, C.J., Strettoi, E., and Masland, R.H. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* **18**: 8936-46.
- Kobayashi, M., Takezawa, S., Hara, K., Yu, R.T., Umesono, Y., Agata, K., Taniwaki, M., Yasuda, K., and Umesono, K. 1999. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4814-9.
- La Spada, A.R., Fu, Y.H., Sopher, B.L., Libby, R.T., Wang, X., Li, L.Y., Einum, D.D., Huang, J., Possin, D.E., Smith, A.C., Martinez, R.A., Koszdin, K.L., Treuting, P.M., Ware, C.B., Hurley, J.B., Ptacek, L.J., and Chen, S. 2001. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron* **31**: 913-27.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spector, B.S., Penney, E.B., Schilling, G., Ross, C.A., Borchelt, D.R., Tapscott, S.J., Young, A.B., Cha, J.H., and Olson, J.M. 2000. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **9**: 1259-71.
- Luthi-Carter, R., Strand, A.D., Hanson, S.A., Kooperberg, C., Schilling, G., La Spada, A.R., Merry, D.E., Young, A.B., Ross, C.A., Borchelt, D.R., and Olson, J.M. 2002. Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet* **11**: 1927-37.

- Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* **50**: 925-47.
- Martinez, E., Kundu, T.K., Fu, J., and Roeder, R.G. 1998. A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* **273**: 23781-5.
- McMahon, S.J., Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. 2005. Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Mears, A.J., Kondo, M., Swain, P.K., Takada, Y., Bush, R.A., Saunders, T.L., Sieving, P.A., and Swaroop, A. 2001. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* **29**: 447-52.
- Michalik, A., Martin, J.J., and Van Broeckhoven, C. 2004. Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet* **12**: 2-15.
- Mitton, K.P., Swain, P.K., Chen, S., Xu, S., Zack, D.J., and Swaroop, A. 2000. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem* **275**: 29794-9.
- Munshi, N., Agaloti, T., Lomvardas, S., Merika, M., Chen, G., and Thanos, D. 2001. Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. *Science* **293**: 1133-6.
- Neophytou, C., Vernallis, A.B., Smith, A., and Raff, M.C. 1997. Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* **124**: 2345-54.
- Nie, Z., Chen, S., Kumar, R., and Zack, D.J. 1996. RER, an evolutionarily conserved sequence upstream of the rhodopsin gene, has enhancer activity. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 2667-75.
- Palhan, V.B., Chen, S., Peng, G.H., Tjernberg, A., Gamper, A.M., Fan, Y., Chait, B.T., La Spada, A.R., and Roeder, R.G. 2005. Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Spector, D.L. and Gasser, S.M. 2003. A molecular dissection of nuclear function. Conference on the dynamic nucleus: questions and implications. *EMBO Rep* **4**: 18-23.
- Sugars, K.L. and Rubinsztein, D.C. 2003. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* **19**: 233-8.
- Vinciguerra, P. and Stutz, F. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 285-92.
- Yoo, S.Y., Pennesi, M.E., Weeber, E.J., Xu, B., Atkinson, R., Chen, S., Armstrong, D.L., Wu, S.M., Sweatt, J.D., and Zoghbi, H.Y. 2003. SCA7 Knockin Mice Model Human SCA7 and Reveal Gradual Accumulation of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Abnormalities in Short-Term Plasticity. *Neuron* **37**: 383-401.
- Yvert, G., Lindenberg, K.S., Picaud, S., Landwehrmeyer, G.B., Sahel, J.A., and Mandel, J.L. 2000. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2491-506.
- Zhang, J., Gray, J., Wu, L., Leone, G., Rowan, S., Cepko, C.L., Zhu, X., Craft, C.M., and Dyer, M.A. 2004. Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. *Nat Genet* **36**: 351-60.

LEGENDS to FIGURES

Figure 1: Severe reorganization of chromatin territories in rod photoreceptors from SCA7 mice

A. Ultrastructure of rod nuclei in R7E mice. Electron microscopy micrographs from 2 year-old R7N (panel a) and two distinct R7E (panels b and c) animals are shown. In R7N mice, rod nuclei are characterized by a large territory of centrally located heterochromatin. In R7E mice, rod nuclei were bigger, rounder and displayed much more euchromatin, which appears lightly stained by electrons. Arrows indicate pale grey structures likely resulting from aggregation of mutant ATXN7 in rods from R7E mice. Scale bar represents 1 μm .

B. Ultrastructure of photoreceptor nuclei during disease progression in R7E mice. Electron microscopy micrographs from 2 year-old R7N (panel a), 2 month-old R7E (panel b) and 2 year-old R7E (panel c) animals are shown. This time-course analysis revealed that alterations of rod nuclear architecture progressively worsened as retinopathy progressed in R7E mice. Cone photoreceptor nuclei (c), which are found in the outermost part of the ONL adjacent to inner segments (is), present a different architecture with several heterochromatin clumps surrounded by more euchromatin.. As evidenced in panel c, rod nuclei in R7E mice look highly similar to cone nuclei. Scale bar represents 5 μm .

C. Ultrastructure of photoreceptor nuclei in SCA7 knock-in mice. Electron microscopy micrographs from 3 month-old WT (panels a and d) and two distinct age-matched SCA7^{266Q/5Q} (panels b, c and e, f) animals are shown. Morphological appearance of the central densely stained heterochromatin territory is altered in mutant mice. At higher magnification (lower panels), rod nuclei from heterozygous knock-in animals are slightly larger and contain more euchromatin than nuclei from control mice. Cone nuclei (c) and photoreceptor inner segments (is) are depicted. Scale bars represent 2 μm in upper panels (a-c) and 0.5 μm in lower panels (e-f).

Figure 2: Chromatin remodeling in rod nuclei paralleled segment loss and *Rho* down-regulation in SCA7 mice.

A. Histological examination of retina from 2 month-old R7N (panels 1, 3) and R7E (panels 2, 4) mice. Toluidin-blue staining of semi-thin sections revealed a discontinuous pattern of segment loss which paralleled an irregular appearance of rod chromatin decondensation in R7E animals (upper panels). High magnification micrographs (lower panels) showed that rods with preserved nuclear morphology are connected with inner segments of normal appearance. Scale bars represent 20 μm in upper panels and 10 μm in lower panels.

B-D. Rhodopsin immunolocalization in 2 month-old R7N and R7E retina.

B. Immunohistochemistry of paraffin-embedded sections were performed using an anti-rhodopsin antibody (4D2). In R7E retina, residual staining was observed in the innermost part of the ONL and in folds in which normal condensed rod nuclei were typically located. Scale bar represents 10 μm .

C-D. Immunofluorescence of retinal cryosections were performed using an anti-rhodopsin antibody (4D2) and DAPI to visualize rod nuclei. Images were collected by confocal imaging analysis, and merged images (rhodopsin in red, DAPI in greyscale) are shown. Very few cells retained rhodopsin staining which circumscribes the nucleus in the ONL (C). Higher magnification images demonstrated that residual staining was exclusively found in rods showing a preserved nuclear morphology (arrows), while no rhodopsin could be detected in rods showing an altered chromatin organization (arrowheads) (D). Scale bar represents 5 μm .

RPE: retinal pigment epithelium , OS: outer segments , IS: inner segments , ONL: outer nuclear layer , INL: inner nuclear layer.

Figure 3: Comprehensive characterization of specific transcriptional alterations in the retina from SCA7 mice.

mRNA levels were quantified by real-time PCR of reverse transcribed RNA from 2 month-old WT and R7E retina. Expression levels are represented as a percentage of the mean of WT littermate mice after normalization to *Ppia* or *Arbp* levels. In each panel, each bar represents the mean value \pm S.E.M. ($n = 3-6$).

A. Down-regulation of genes encoding transcription factors, *Crx*, *Nrl* and *Nr2e3*, involved in photoreceptor differentiation and maintenance.

B. Expression analysis of cone-specific genes, *Bcp*, *Gnat2* and *Carr*, in WT and R7E animals.

C. Severe down-regulation of rod-specific genes, *Rho*, *Gnat1*, *Pde6b*, *Rhok*, *Rom* and *Rbp3*, encoding components of the phototransduction machinery.

Figure 4: Decreased RNA polymerase II occupancy at promoters and coding regions of genes down-regulated in SCA7 mice

Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) were performed using formaldehyde-fixed chromatin extracts of retina from 2 month-old control (WT or R7N; dark grey) and R7E (light grey) mice. Specific regions within the different genes were analyzed, as depicted; within the *Rho* gene, each amplified regions were separated by 1.5 kb at least. Each bar represents the mean value \pm SEM ($n = 4-6$). RNA polymerase II occupancy, and thus transcriptional activity, was assessed using an antibody directed against the heptapeptide repeat of its C-terminal domain (Pol II CTD). All genes down-regulated at the mRNA level in R7E retina (*Rho*, *Pde6b*, *Rbp3*, *Nrl* and *Crx*) showed marked decrease in Pol II occupancy at their promoters.

Figure 5: Loss of a specific gene compartmentalization in rods from SCA7 mice

A-F. BAC probes containing *Rho* (A-C) or *Acta2* (D-F) genes were hybridized to retinal cryosections from 2 month-old WT (A, B, D, E) or R7E (C, F) animals. FISH signals appear in green while DAPI-stained photoreceptor nuclei were pseudo-coloured in red for better

visualization. Merged images were collected by confocal imaging analysis and showed co-localization of *Acta2* within the densely DAPI-stained heterochromatin region in WT rod nuclei (arrowheads in D and E). By contrast, *Rho* was excluded from this compact heterochromatin region. In R7E rod nuclei, *Rho* and *Acta2* showed a comparable random pattern of intranuclear distribution. Both could be found co-localizing within the central densely DAPI-stained region (arrowheads in C and F). Scale bars represent 2 μ m.

G. Distribution of *Rho* and *Acta2* between heterochromatin and euchromatin territories in WT and R7E rod nuclei was estimated by counting the number of spots detected in the densely DAPI-stained region. Counting was performed on the projection of four consecutive z stacks (1.2 μ m between each stack) taken through the retinal section such as only entire rod nuclei were included in the counting. More than 500 nuclei were analyzed and each bar represents the mean value \pm SEM of three independent experiments performed on two different animals.

Figure 6: TFTC subunit composition and histone acetyl transferase activity is not altered by ATXN7 polyglutamine expansion in R7E retina.

A. Western blot analysis of TFTC-type complexes immunopurified from 4 week-old R7N or R7E retinal homogenates using an anti-ATXN7 antibody. ATXN7 immunoprecipitations (IPs) performed on increasing amount of input material revealed comparable levels of Trrap and Gcn5 in complexes purified from R7N or R7E retina.

B-C. Whole retinal extracts from 4 week-old R7N and R7E animals were immunoprecipitated (IPed) with an anti-SPT3 (B) and anti-TRRAP antibody (C). Using the same antibodies complexes were also IPed from HeLa cell nuclear extract as positive controls. The retinal extracts (Input) and the immunopurified complexes were analyzed by immunoblotting with an anti-ATXN7 antibody. Complexes contained similar amounts of normal or mutant ATXN7.

D. Western blot analysis using anti-TRRAP and anti-GCN5 antibodies on complexes IPed with an anti-TRRAP antibody from 10 week-old R7N and R7E retinal homogenates. Using the same antibody, complexes were also IPed from HeLa cell nuclear extract as positive control. Comparable levels of Gcn5 and Trrap were detected in purified complexes from R7N and R7E retina.

E-G. HAT activities of immunopurified complexes bound to either the anti-ATXN7 pAb (E), anti-SPT3 mAb (F) or anti-TRRAP mAb beads (G) from R7N and R7E retina were measured by an *in vitro* HAT assay performed on free core histones. Histones were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue (CBB) and acetylated histones were visualized by fluorography (Fluorogr.). The position of each histone is indicated. The pattern of histone acetylation was identical to that of a highly purified TFTC fraction used as a positive control. No histone acetylation could be detected when the antibody was omitted. The age of the mice are indicated in weeks in brackets.

Figure 7: Increased TFTC recruitment and histone acetylation at a specific subset of deregulated genes in the retina of SCA7 mice.

Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) were performed using formaldehyde-fixed chromatin extracts of retina from 2 month-old control (WT or R7N; dark grey) and R7E (light grey) mice. Primers were selected to amplify promoter or enhancer regions of the specified genes, as depicted.

A-B. ChIPs using an antibody against a TFTC-specific subunit (Spt3) revealed an increased recruitment of Spt3 in R7E retina, at promoters from genes normally highly and specifically expressed in differentiated rods, namely *Rho*, *Pde6b* and *Rbp3*. No such differences could be observed at promoters from two genes regulating rod terminal differentiation, *Crx* and *Nrl* and at the intronic enhancer region of a house-keeping gene, *Ncl*.

C-D. ChIPs using an antibody against acetylated lysines 9 and 14 of histone H3 (Ac H3) revealed an increased acetylation of histone H3 in R7E retina, specifically at the same promoters, which showed increased Spt3 binding (*Rho*, *Pde6b* and *Rbp3*). Promoters from *Crx*, *Nrl* and *Ncl* did not show any differences in histone H3 acetylation.

The amount of immunoprecipitated DNA was quantified by real-time PCR and normalized to the amount of DNA present in a fraction of the input chromatin extract. Values are expressed as fold enrichment over background immunoprecipitation signals obtained in corresponding no antibody ChIP experiments (see Figure S8). Each bar represents the mean value \pm SEM ($n = 4$).

Figure 1, Helmlinger et al.

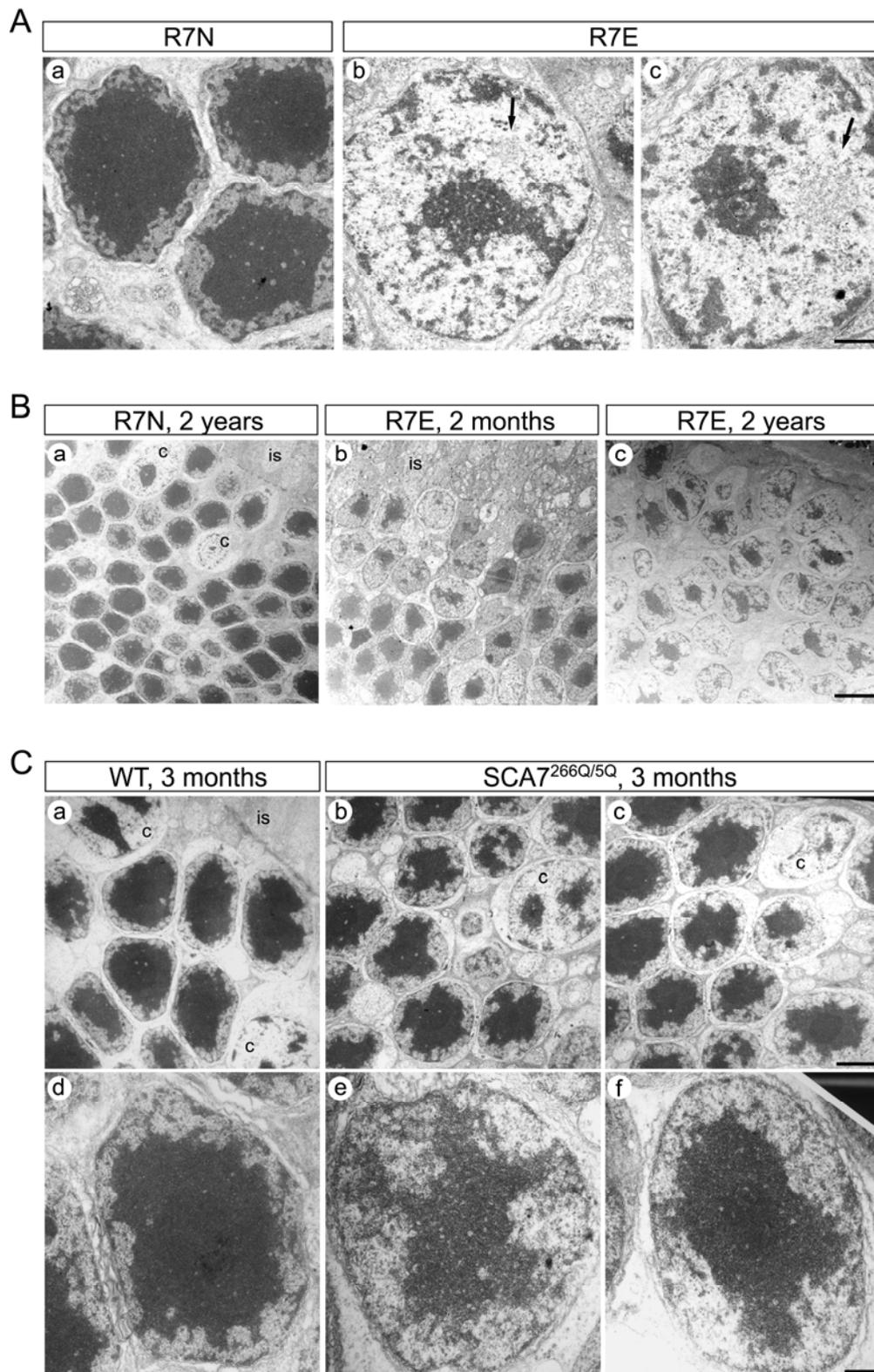


Figure 2, Helmlinger et al.

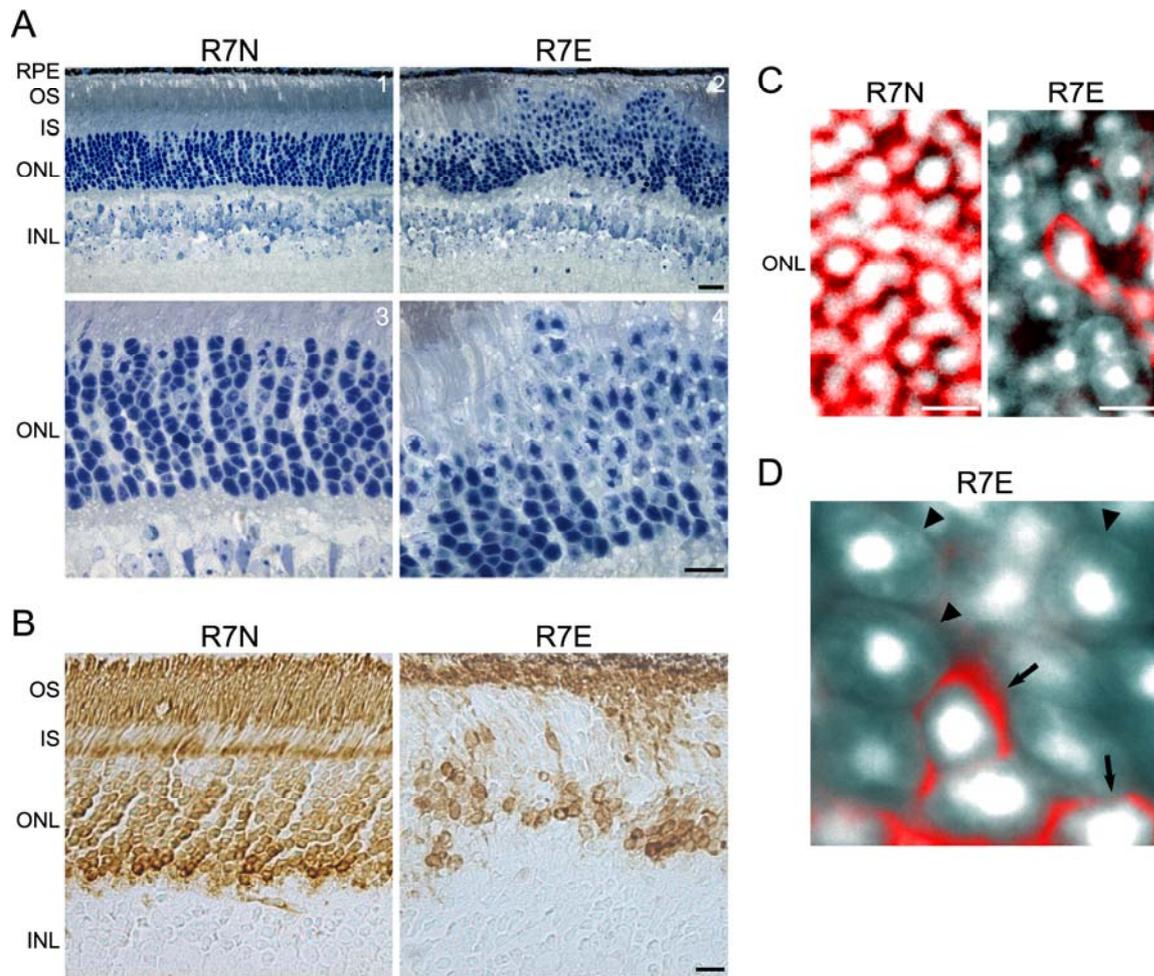


Figure 3, Helmlinger et al.

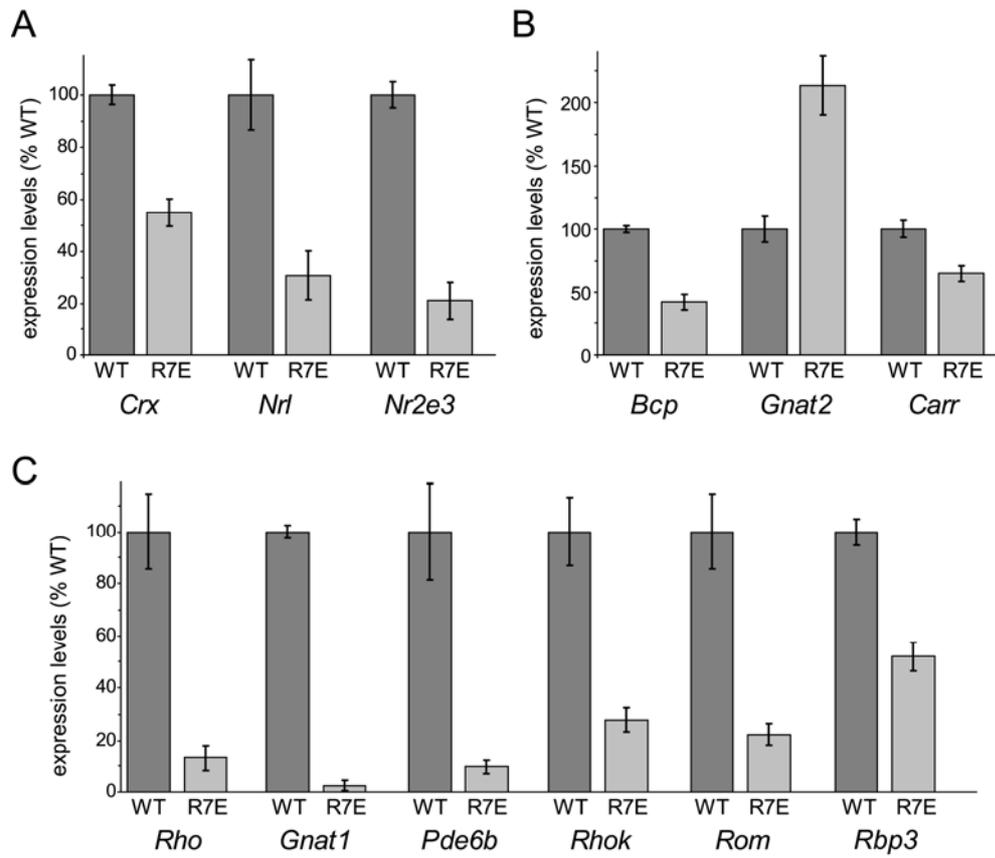


Figure 4, Helmlinger et al.

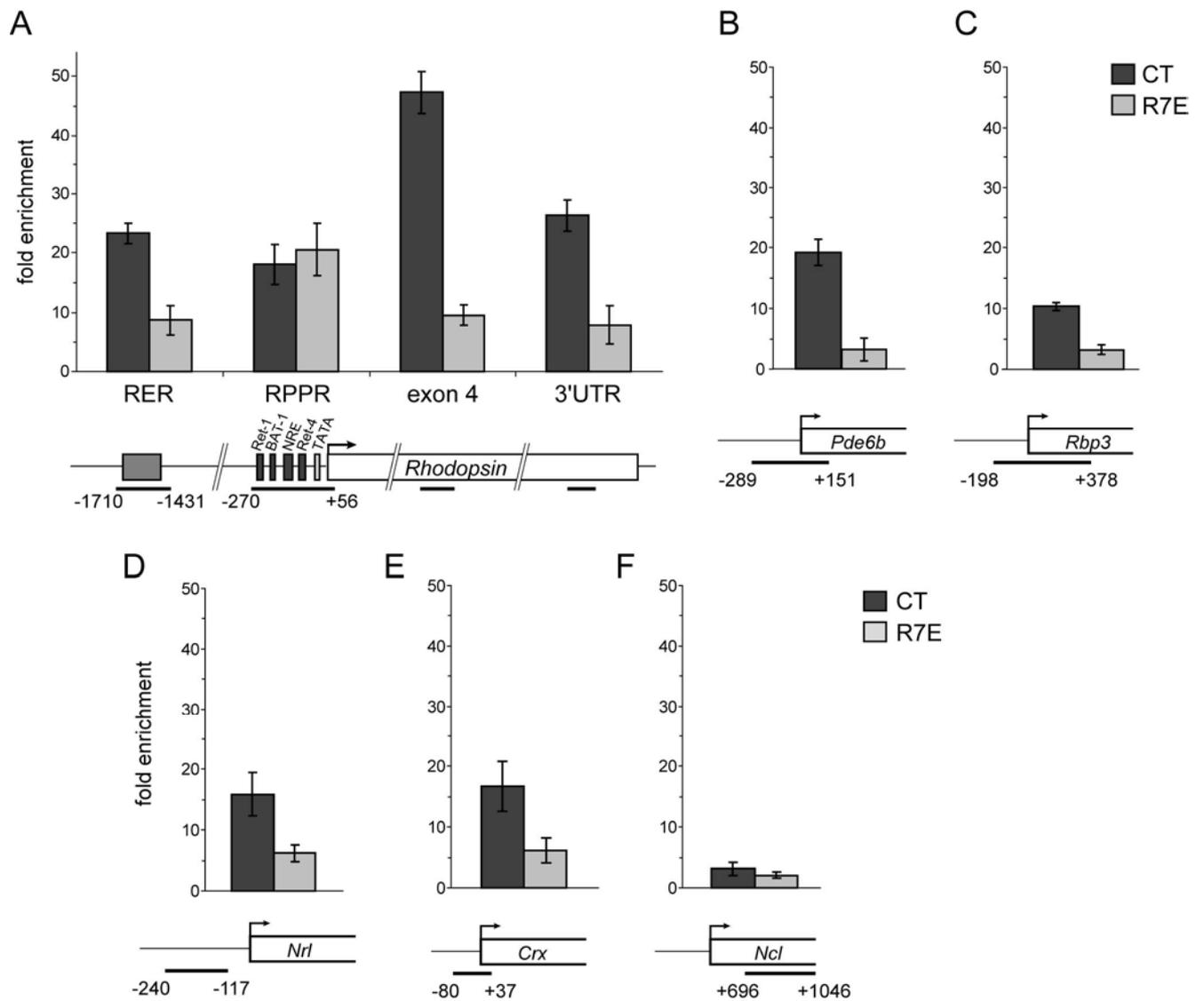


Figure 5, Helmlinger et al.

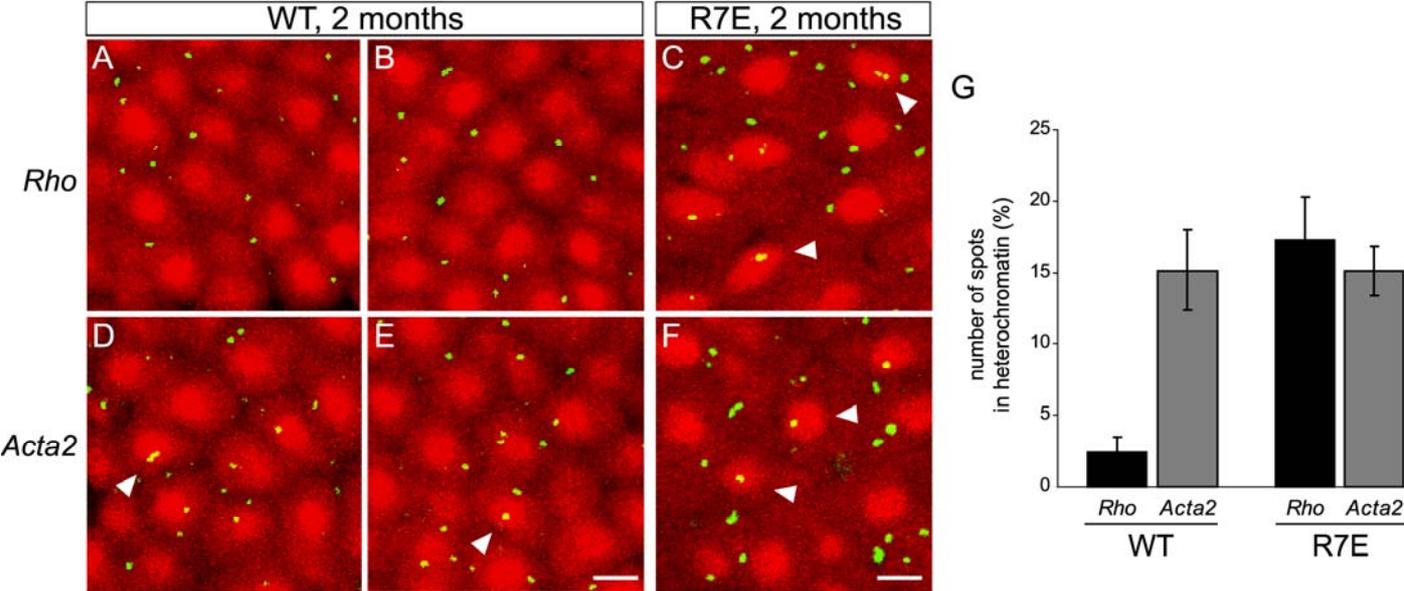


Figure 6, Helmlinger et al.

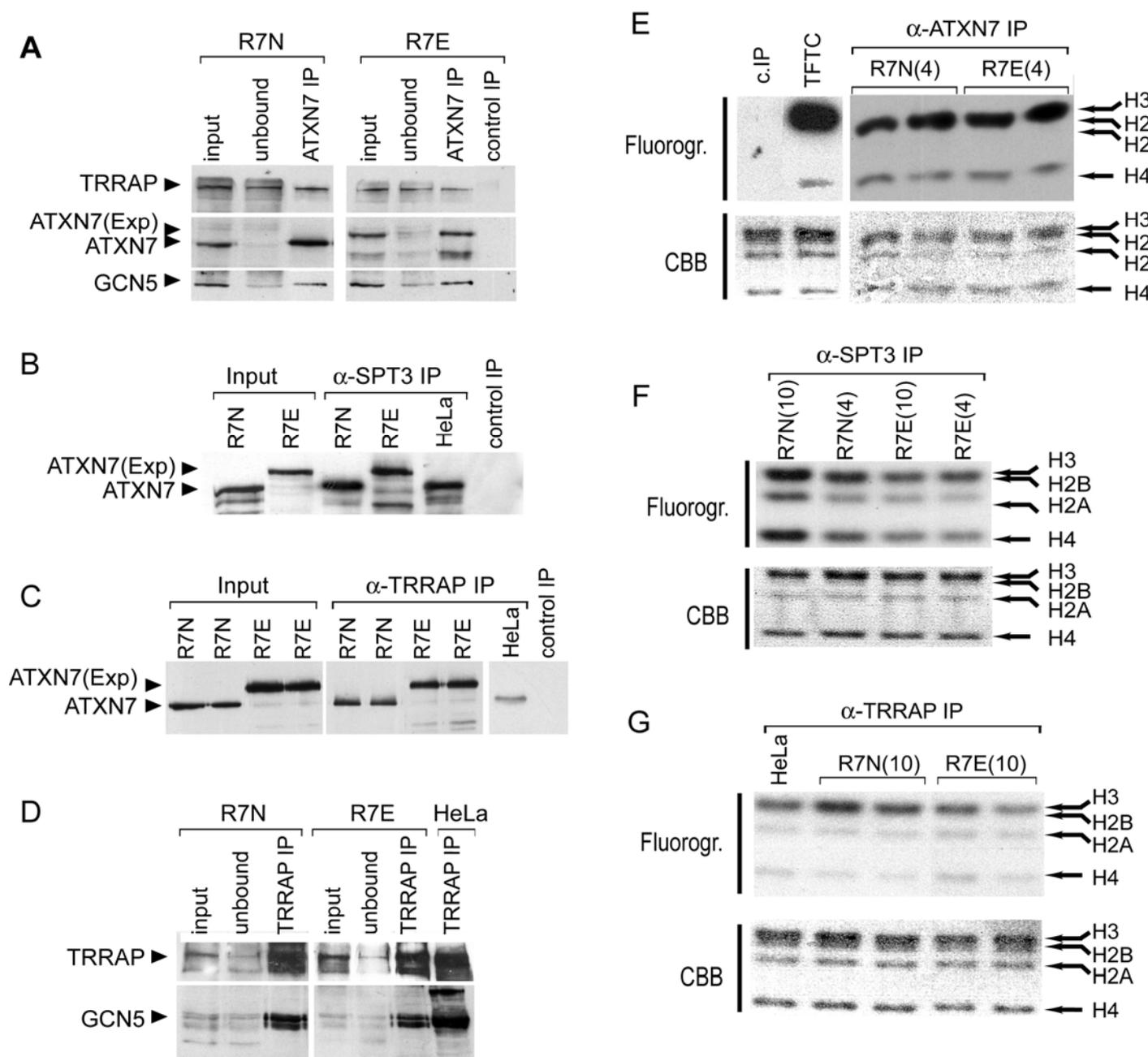
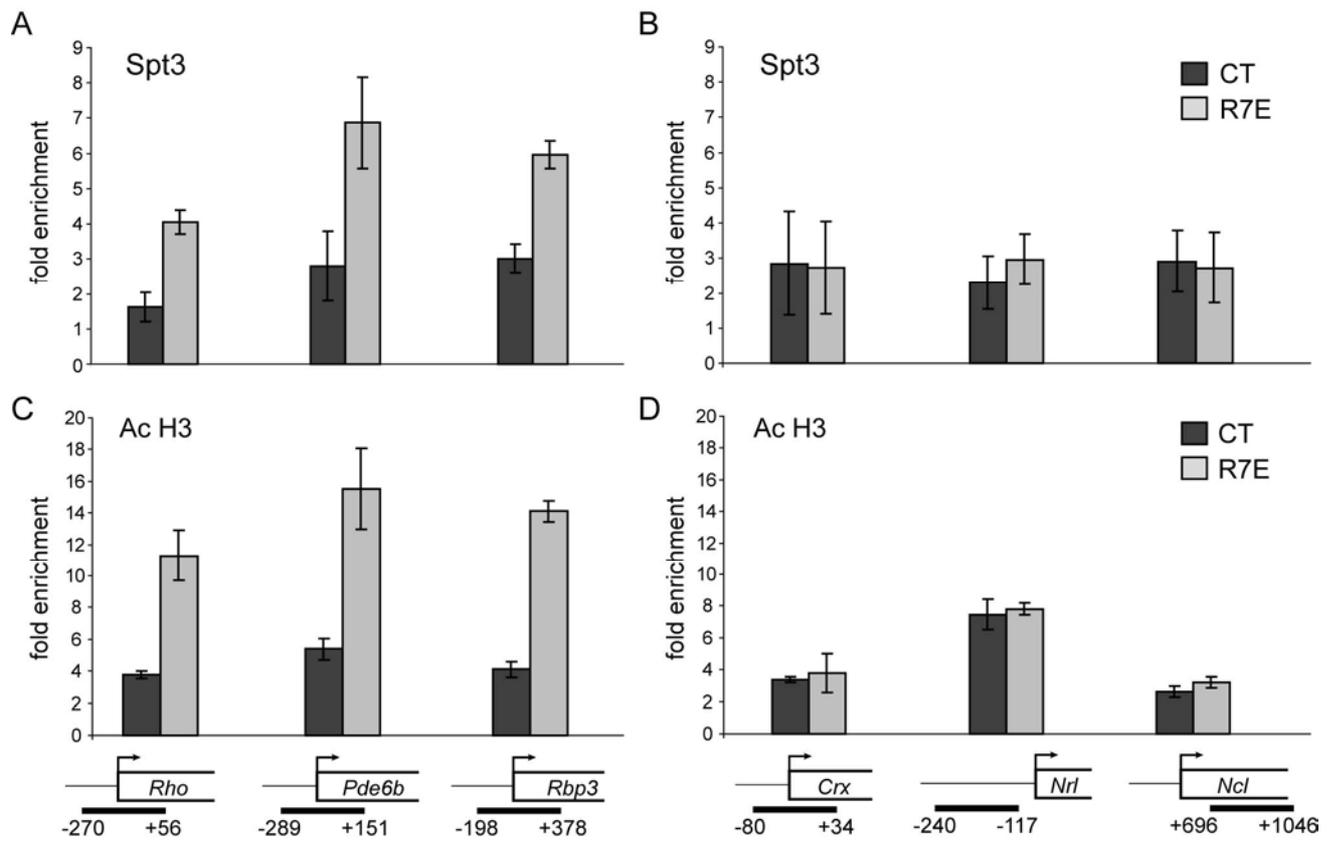


Figure 7, Helmlinger et al.



4.4 – Discussion

4.4.1 – ATX7, sous-unité du complexe TFTC

Plusieurs expériences attestent de la présence de ATXN7 au sein du complexe TFTC.

Tout d'abord, ATXN7 est spécifiquement coimmunoprécipité avec les sous-unités TAF10, TRRAP, GCN5 de TFTC dans des cellules HeLa (IP ATXN7, IP TRRAP, et IP TAF10, IP SPT3, résultats non montrés). De plus, cette interaction s'avère spécifique, et TBP n'interagit pas avec ATXN7. Ainsi ATXN7 serait spécifiquement identifiée au sein de complexes dépourvus de protéine TBP.

D'autre part, les profils d'acétylation de TFTC et des immunoprécipitats de ATXN7 sont similaires (test acétylation sur histones libres). Il est surprenant de constater que les tests HATs menées à partir d'histones agencés en nucléosomes révèlent un profil d'acétylation différent pour TFTC et les immunoprécipitats de ATXN7 : tandis que TFTC conserve sa capacité à acétyler principalement l'histone H3, les immunoprécipitats de ATXN7 acétylent préférentiellement l'histone H4 (Résultats non montrés). Cette différence de profil d'acétylation suggère qu'ATXN7 interagisse avec d'autres HATs hormis GCN5, mais cette hypothèse reste à tester.

Pour vérifier qu'ATXN7 interagit avec TFTC, des expériences d'affinité GST-ATXN7 ont été entreprises. La séquence peptidique de ATXN7 comporte trois blocs conservés, et les expériences d'affinité montrent que le bloc II (aa 330 à 401), comportant un motif qui lie le zinc, suffit pour l'interaction avec les sous-unités de TFTC telles que TAF10 et GCN5. Ce bloc II est doté de résidus très conservés et est hautement homologue à SGF73 chez la levure, sous-unité du complexe SAGA.

Enfin, l'interaction entre ATXN7 et TFTC a également été vérifiée avec des expériences de transfection où ATXN7 est surexprimée. Il est maintenant bien établi que ATXN7 normale et TFTC interagissent.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'influence de l'expansion de polyglutamine dans ATXN7 mutée sur l'interaction entre ATXN7 et TFTC. Les résultats ont montré qu'ATXN7 mutée est toujours capable d'interagir avec les sous-unités de TFTC. De plus, l'agrégation de ATXN7 mutée en inclusions au niveau du noyau est sans conséquences sur la localisation de sous-unité de TFTC telles que TAF10. L'expansion de polyglutamine est localisée au niveau de la partie N-terminale de ATXN7. TFTC, pour sa part, interagit avec le bloc II d'ATXN7, et cette interaction n'est pas perturbée par l'expansion située en N-terminale de ATXN7.

En conclusion, ces études ont révélé une interaction entre ATXN7 et le complexe TFTC. Cette interaction est spécifique et n'est pas modifiée par l'expansion de polyglutamine au niveau de ATXN7.

Cependant, certaines caractéristiques de l'interaction ATXN7/TFTC restent à déterminer. Des travaux ont été entrepris au laboratoire pour identifier la (les) sous-unités de TFTC impliquée(s) dans l'interaction avec ATXN7 (Antoinette Hakme).

Nous envisageons également d'immunolocaliser ATXN7 au sein du complexe TFTC par microscopie électronique (collaboration laboratoire de P.Schultz). L'identification des interactants directs d'ATXN7 permettra éventuellement de trouver de nouvelles pistes fonctionnelles quant à la protéine ATXN7.

Chez la levure, le complexe SAGA contient une protéine identifiée récemment, la protéine Sgf11 (Ingvarsdottir et al., 2005). Or, Sgf11 possède des homologies de séquences avec ATXN-L3 chez l'humain (au niveau du bloc I). Il est probable qu'en plus de contenir la protéine ATXN7, le complexe TFTC intègre aussi son homologue, la protéine ATXN7-L3. Cette découverte permettrait d'ouvrir de formidables perspectives pour l'étude fonctionnelle du complexe TFTC. En effet, chez la levure, la protéine Sgf11 lie la protéine Ubp8 qui régule l'ubiquitination de H2B. Il serait tout à fait intéressant de tester l'implication de TFTC dans la régulation de cette modification post-traductionnelle au niveau de H2B.

4.4.2 – Ataxie spinocerebelleuse de type 7 et désorganisation de la structure de la chromatine

L'observation d'une structure chromatinienne complètement désorganisée dans les cellules R7E (ATXN7 avec expansion polyglutamine) est très intéressante.

Alors que les batônnetts de souris normales sont de très petite taille (5µm), ont une forme polyédrique et sont formés par une large région d'hétérochromatine centrale entourée d'une fine couche d'euchromatine périphérique, les batônnetts des souris mutées présentent un noyau de taille supérieure, et contiennent une large région d'euchromatine, dispersée par quelques îlots d'hétérochromatine.

Cette décondensation de la chromatine suggère une dérégulation au niveau de l'expression des gènes. Comme l'on montré Dominique Helmlinger et Didier Devys, l'expression de nombreux gènes spécifiques des photorécepteurs est diminuée dans les rétines des souris R7E (gènes *Crx*, *Nrl*, *Nr2e3*, *Rho*, *Gnat1*, etc...). Ces études ont permis de corréliser une désorganisation de la chromatine à une dérégulation de l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans les batônnetts.

Toutefois, ces études conduisent à plusieurs contradictions apparentes. Tout d'abord, le remodelage complet de la chromatine dans les cellules R7E n'induit pas d'altération globale de l'expression des gènes, mais une répression d'environ 2% du transcriptome, en particulier des gènes spécifiquement exprimés dans la rétine. De plus, la répression de l'expression de gènes spécifiques au niveau de la rétine est en opposition avec la structure décondensée de la chromatine. En effet, la structure ouverte, décondensée de la chromatine est généralement associée aux régions actives en transcription.

Pourquoi la structure de la chromatine est-elle si différente lorsque ATXN7 comporte l'expansion de polyglutamine ? Comme nous l'avons vus dans la publication n°1, Ataxine 7

est retrouvée au sein du complexe TFTC étudié dans notre laboratoire. Or, ce complexe est doué d'une activité HAT. Il était alors logique de suspecter une modification d'activité HAT liée à TFTC lorsqu'ataxine 7 mutée est intégré dans le complexe.

Dans un premier temps, des tests HATs menés *in vitro*, sur des histones libres ou agencés en nucléosomes, n'ont pas montré de différence d'activité HAT liée à Ataxine7, TRRAP ou bien encore SPT3, entre les rétines normales ou mutées pour ataxine7. Globalement, l'activité HAT liée à TFTC n'est pas modifiée dans les cellules R7E. Ainsi ATXN7 mutée s'intègre au complexe TFTC (publication n°1), sans pour autant modifier la capacité de TFTC à acétyler les histones d'une manière globale.

Cependant, la mutation dans ataxine 7 perturbe uniquement la transcription de quelques gènes dans le modèle SCA7 étudié. Il est possible que l'expansion de polyglutamine provoque des modifications fonctionnelles de TFTC uniquement au niveau des promoteurs de ces gènes.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'acétylation, ainsi que la présence de TFTC, au niveau des promoteurs de gènes sous-régulés. Pour cela, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées et montrent que l'acétylation de l'histone H3 ainsi que le recrutement du complexe TFTC est spécifiquement accru au niveau de certains gènes sous-régulés (*Rho*, *Pde6b*, *Rbp3*), tandis qu'aucune modification n'est observée au niveau d'autres gènes (*Crx*, *Nrl*) dans les cellules R7E.

Alors que l'expansion de polyglutamine au niveau d'ATXN7 est sans conséquence sur son incorporation au complexe TFTC, celle-ci semble être à l'origine d'une dérégulation fonctionnelle de TFTC marquée par une hyperacétylation au niveau de promoteurs spécifiques. Cependant, il serait intéressant de savoir si la fixation accrue de TFTC (dans les rétines R7E) n'a lieu qu'au niveau de certains promoteurs ou plus globalement sur l'ensemble du génome. Il est possible que TFTC intégrant ATXN7 mutée voit sa capacité à se fixer au niveau de régions spécifiques modifiée.

Ces résultats mettent en évidence un paradoxe : le promoteur du gène *Rho* est hyperacétylé et sa transcription inhibée. Les gènes sous-régulés seraient comme « prêts à être transcrits » : il est possible qu'un signal particulier soit capable d'induire rapidement la transcription au niveau de ces gènes, puisque la chromatine est déjà acétylée. Ce concept de « gènes inactifs, mais prêts à être transcrits » est très intéressant. Dans notre cas, il n'est observé qu'en présence d'ATXN7 mutée. Il serait particulièrement important de comprendre le signal qui conduit à l'expression de ces gènes. Ceci permettrait de développer des médicaments qui ralentiraient la dégénérescence de la rétine.

L'hyperacétylation au niveau des promoteurs *Rho*, *Pde6b*, *Rbp3* concorde avec la structure de la chromatine décondensée observée dans les cellules rétinienne R7E. Cependant, comme l'ont montré les tests HATs, le niveau global d'acétylation n'est pas modifié dans les cellules R7E. L'hyperacétylation locale n'explique pas pourquoi la structure de la chromatine est si différente pour les mutants R7E. Les batonnets normaux acquièrent une structure de la chromatine très particulière au cours de leur différenciation. Il serait très intéressant d'étudier la répartition des variants d'histones de différentes rétines de souris

normales et de souris SCA7. Il est possible que l'expression d'un variant d'histone influe la structure de la chromatine (Ahmad and Henikoff, 2002 ; Henikoff et al., 2004 ; Kamakaka and Biggins, 2005).

Ces études ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour le laboratoire. Le Docteur Didier Devys, a d'ailleurs rejoint notre laboratoire pour se consacrer à ces questions captivantes.

Tout d'abord, nous disposons maintenant d'un modèle animal dans lequel une sous-unité spécifique de TFTC, ataxine 7 peut s'intégrer mutée au complexe. Les différences fonctionnelles entre deux formes distinctes du complexe TFTC, l'une dotée d'ATXN7 normale, l'autre d'ATXN7 mutée, seraient très intéressantes à étudier. Nous pouvons faire l'hypothèse que la forme TFTC comportant ATXN7 mutée perd sa capacité à activer la transcription, alors qu'elle se fixe toujours au niveau du promoteur (voir CHIP publication 2). Toutefois, cette hypothèse demande à être vérifiée, à l'aide de tests de transcription *in vitro*, par exemple.

D'autre part, nous savons maintenant que la mutation d'une sous-unité de TFTC (ATXN7) est directement corrélée au développement d'une maladie neurodégénérative, l'ataxie spinocerebelleuse de type 7. Si nous mettons en évidence une fonction de TFTC particulièrement perturbée par la présence d'ATXN7 mutée, cela ouvre la voie au développement de substances permettant de restaurer la fonction dérégulée. Ces études sont susceptibles d'aboutir au développement de médicaments pour contrer l'ataxie spinocerebelleuse de type 7.

Enfin, ce modèle est particulièrement intéressant pour étudier les relations entre la structure de la chromatine (son niveau de compaction) et la régulation d'expression de gènes.

DISCUSSION

1 – TRRAP, COACTIVATEUR TRANSCRIPTIONNEL

1.1 – TRRAP et la transcription activée par VP16 et par les œstrogènes : notre étude

Nos études révèlent que TRRAP est impliquée dans **l'activation de la transcription par VP16 *in vitro*** et par **les œstrogènes *in vivo***.

Ces études concordent avec celles réalisées chez la levure, qui ont établi que Tra1, l'homologue de TRRAP, active la transcription *in vitro*, sur une matrice de chromatine (Brown et al., 2001a). Certains résultats similaires *in vivo* conduisent à la conclusion que TRRAP se fixe spécifiquement au niveau du promoteur suite à l'induction de la transcription par VP16 (Bhaumik et al., 2004; Memedula and Belmont, 2003). L'implication de TRRAP dans l'activation de la transcription par VP16, *in vitro* comme *in vivo*, est difficilement discutable.

L'engagement de **TRRAP dans l'activation de la transcription par les œstrogènes** est également bien documentée. L'inhibition de TRRAP lors de transfections transitoires provoque une réduction de l'activation de la transcription par les œstrogènes (partie II résultats de la présente thèse, (Yanagisawa et al., 2002)). En outre, TRRAP se fixe précocément sur les promoteurs endogènes de pS2 et de la cathepsine D en présence d'œstrogènes, ce qui sous-entend une participation de TRRAP à l'activation de la transcription (partie II Résultats). Il s'avère que TRRAP est un coactivateur de la transcription par les œstrogènes, comme l'ont démontré divers travaux.

Il serait toutefois très intéressant d'entreprendre des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide de cellules *Trrap*^{-/-} pour confirmer l'importance du rôle joué par TRRAP dans l'activation de la transcription par les œstrogènes *in vivo* (pour voir par exemple si TIP60 et GCN5 se fixent encore sans TRRAP). De plus, la réalisation d'expériences de double-immunoprécipitations de la chromatine serait une démarche élégante pour identifier les protéines liées à TRRAP durant le processus d'activation de la transcription, et apporterait une vision plus globale et dynamique des complexes présents au niveau de ces promoteurs.

1.2 – TRRAP se lie à différents activateurs

On présume que TRRAP participe à l'activation de la transcription a été présumée, puisque cette protéine se lie, *in vitro* comme *in vivo*, à de nombreux activateurs. Par ailleurs, TRRAP se lie à d'autres facteurs de transcription (comme les TAFs), et elle pourrait servir de lien entre les activateurs et les composants de la machinerie transcriptionnelle pour activer la transcription.

Les résultats présentés dans cette thèse révèlent qu'*in vitro*, TFTC se fixe à l'activateur VP16 (publication 1), et ceux de Yanagisawa et *al.* montrent que TFTC se lie au récepteur aux œstrogènes exclusivement en présence d'œstrogènes (Yanagisawa et al., 2002).

Chez la levure, le domaine en C-terminal de la protéine Tra1 est lié à l'activateur VP16 (Bhaumik et al., 2004; Brown et al., 2001a). Chez l'humain, nous avons tenté de

déterminer quelle région de **TRRAP** est fonctionnellement **associée à VP16**, sans grand succès. La stratégie adoptée a été de cotransfecter des vecteurs codant pour différentes régions de TRRAP avec un vecteur dont l'expression répond à VP16. Les peptides de TRRAP générés ont inhibé l'activation de la transcription, mais contrairement à notre attente, tous les peptides avaient un pouvoir inhibiteur. Au vu de ces résultats, nous avons pensé que plusieurs régions de la protéine TRRAP sont nécessaires à la liaison de VP16, mais ces données restent à confirmer par des études d'interactions entre protéines plus systématiques (*in vitro*, à l'aide de protéines purifiées).

Bien que nous ayons démontré que TRRAP se lie à VP16, nos études ne permettent pas d'affirmer si cette interaction est directe ou non. Les études chez la levure, par contre, mettent clairement en évidence une interaction directe entre VP16 et le domaine C terminal de Tra1. Par ailleurs, Tra1 se fixe directement à d'autres activateurs, tels que GCN4, GAL4, ou encore HAP4 (Bhaumik et al., 2004 ; Brown et al., 2001a ; Qiu et al., 2005).

Les résultats de la présente thèse soulignent l'importance de **TRRAP dans l'activation de la transcription par les œstrogènes**, lors d'expériences de transfection transitoires (partie résultats II). D'autres études ont par ailleurs montré que TRRAP se fixe spécifiquement au niveau du récepteur aux œstrogènes en présence de ligand *in vivo*. En parallèle, des études d'interaction *in vitro* ont permis d'identifier une région de TRRAP (acides aminés 900 à 1394) responsable de l'interaction entre TRRAP et ER α (Yanagisawa et al., 2002). Cette région comporte trois motifs LXXLL responsables de la liaison avec les récepteurs nucléaires (Savkur and Burris, 2004). Outre le récepteur aux œstrogènes, TRRAP est connecté à d'autres récepteurs nucléaires, comme VDR ou bien PPAR γ *in vitro* (chromatographie d'affinité GST-VDR et GST-PPAR γ) (Yanagisawa et al., 2002), ainsi que LXR (Unno et al., 2005). La protéine TRRAP compte dix motifs LXXLL, parmi lesquels trois sont importants pour la liaison de ER α (aa 900 à 1394) et cinq pour l'interaction avec LXR (aa 581 à 1394 et la région C-terminale de TRRAP partagée avec les PI3K) (voir Figure 38). La région N-terminale de la protéine TRRAP, qui comporte les motifs LLXXLL, est indispensable au recrutement des récepteurs nucléaires.

Comme nous l'avons vu en introduction, TRRAP interagit avec divers facteurs de transcription : c-myc, E1A, E2F, p53 et ING1 (Lang and Hearing, 2003 ; Lang et al., 2001 ; McMahon et al., 1998 ; Vieyra et al., 2002). Par contre, les domaines de TRRAP qui interagissent avec ces facteurs ne sont pas connus. Délimiter les domaines de TRRAP responsables de la connexion avec ces facteurs permettrait de savoir si la région de TRRAP qui interagit avec ces facteurs de transcription se limite à l'extrémité N-terminale, ou si elle s'étend aux autres régions de TRRAP. De plus, il serait intéressant de savoir si plusieurs protéines se lient au niveau de la même région de TRRAP. Si tel est le cas, ces protéines pourraient entrer en compétition pour lier TRRAP lors de différents processus biologiques de la cellule.

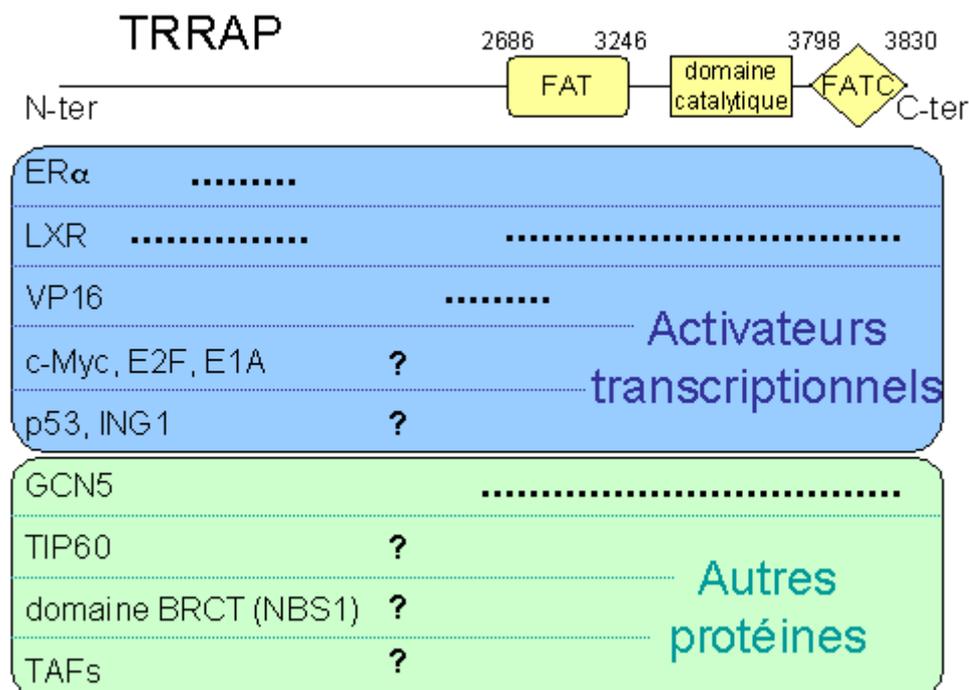


Figure 38 : Différents domaines de TRRAP interagissent avec diverse protéines.

Comme les protéines de la famille des PIKK, la protéine TRRAP est composée de domaine FAT et FATC et un domaine catalytique des kinases, bien que celui-ci ne soit pas fonctionnel.

Divers activateurs de la transcription interagissent avec certaines régions de la protéine TRRAP, comme représenté par des lignes pointillées, d'après les études (Brown et al., 2001a ; Lang and Hearing, 2003; Lang et al., 2001 ; McMahon et al., 1998 ; Unno et al., 2005 ; Yanagisawa et al., 2002). D'autres protéines se lient directement ou indirectement à des domaines de TRRAP inconnus à l'heure actuelle.

1.3 – Quels gènes cibles pour la protéine TRRAP ?

Divers travaux ont abouti à la découverte de gènes dont l'expression est modulée par TRRAP.

Premièrement, TRRAP, en tant que coactivateur, participe à l'activation de la transcription de gènes cibles de c-myc, tels les gènes *TERT* (Nikiforov et al., 2002), *cycline D2* (Bouchard et al., 2001), *CAD*, *OCD*, *NUC*, *GAPT*, *HSP60* (Frank et al., 2003; Frank et al., 2001), ou les gènes cibles de p53, comme par exemple *p21(WAF1)*(Ard et al., 2002), ou encore les gènes cibles de E2F, *MCM4*, *MCM3*, *PCNA*, *p107* (Taubert et al., 2004). L'activation de la transcription de la plupart de ces gènes est couplée à l'acétylation des histones.

Deuxièmement, l'influence de TRRAP sur l'expression d'une grande quantité de gènes a été analysé à l'aide de puces à ADN. Sur 17 664 transcrits, la perte de TRRAP résulte en un défaut d'expression de nombreux gènes, dont l'expression est amoindrie pour 71% des gènes et augmentée pour 29% dans les cellules mitotiques (Herceg et al., 2003). La classification fonctionnelle de ces gènes indique que TRRAP influence divers processus cellulaires, tels que la progression du cycle, l'adhérence entre cellules, la biosynthèse des protéines, le cytosquelette, la transmission de signaux intracellulaires, ou encore le

métabolisme (Herceg et al., 2003). Ces données élargissent le champ d'action de TRRAP comme facteur de transcription. TRRAP est non seulement impliqué dans l'activation de la transcription de gènes induits, mais aussi dans toute une panoplie de gènes ubiquitaires.

Troisièmement, la réalisation d'expériences de « ChIP-on-chip » révèle que TRRAP peut se fixer au niveau des promoteurs de gènes ribosomiques ou d'ARN de transfert (Stunnenberg, Heidelberg, Août 2004). Par ailleurs, certains interactants de TRRAP, tels TIP60 ou c-myc, participent à la transcription de gènes ribosomiques en l'activant (Arabi et al., 2005; Halkidou et al., 2004). Plusieurs indices convergent vers une implication possible de la protéine TRRAP dans l'activation de la transcription des ARN ribosomiques. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse, et de tester si TRRAP est spécifiquement retrouvé au sein d'un complexe multiprotéique particulier pour activer l'expression des gènes de classe I et de classe III.

A ce jour, de nombreux gènes cibles de TRRAP sont connus. L'identification de ces cibles souligne le rôle que joue très probablement TRRAP dans le cycle cellulaire. Vu que TRRAP est partagé entre plusieurs complexes multiprotéiques, il faudrait désormais étudier la participation des autres sous-unités des complexes à la transcription des gènes cibles de TRRAP.

Une piste possible pour commencer à répondre à cette question serait de réaliser des expériences de microarray à l'aide de cellules KO pour différentes sous-unités des complexes TRRAP, puis confronter les résultats obtenus, de manière à déterminer des gènes cibles communs aux différentes sous-unités d'un même complexe.

1.4 – TRRAP, plateforme pour recruter des activités HATs

1.4.1 – TRRAP, le tremplin pour recruter des activités HATs

La protéine TRRAP interagit d'une part avec des activateurs transcriptionnels et d'autre part avec des protéines douées d'activités HATs. Il a été proposé que TRRAP joue un rôle déterminant d'intermédiaire entre des protéines pourvues d'activités HAT et les activateurs. TRRAP serait responsable du recrutement des HATs, telles que TIP60 ou GCN5, au niveau de promoteurs de gènes à transcrire.

1.4.1.1 – Les activités HATs liées à TRRAP sont modulables

Certaines protéines liées à TRRAP sont douées d'activité HATs. Comme l'ont montré les tests HATs réalisés *in vitro* sur des histones libres (partie Résultats III), les immunoprécipitats de TRRAP conjuguent la capacité de TIP60 à acétyler les histones H4 et H2B et celle de GCN5 à acétyler les histones H3 et plus faiblement H4. Cependant, les résidus acétylés n'ont pas été identifiés, et ces études n'excluent pas que TRRAP soit liée à d'autres HATs hormis TIP60 et GCN5.

Lorsque l'activité HAT des immunoprécipitats de TRRAP a été testé sur des histones agencés cette fois en nucléosomes, nous avons remarqué que leur spécificité de substrat s'en

trouvait complètement modifiée. En effet, les interactants de TRRAP acétylent dans ces conditions principalement les histones H4 et H2A, reflétant uniquement le profil d'activité HAT de la protéine TIP60 (résultats non montrés). L'activité HAT de GCN5 n'est presque plus détectable. Or, GCN5 est tout à fait compétent pour acétyler les histones H3 et H4 agencés en nucléosome lorsqu'il se trouve au sein du complexe TFIIIC purifié (Brand et al., 1999b). Ainsi il semble que la capacité de GCN5 à acétyler les nucléosomes change en fonction de son environnement protéique. Ce concept est crucial, car il permet de comprendre qu'*in vivo*, les activités enzymatiques sont finement régulées en fonction de la présence de protéines avoisinantes.

L'intégration des HATs au sein de complexes multiprotéiques divers est sans doute une étape critique pour exercer leur activité HAT *in vivo*. D'ailleurs, certaines HATs recombinantes sont incapables d'acétyler les histones agencés en nucléosomes (Grant et al., 1998a ; Ogryzko et al., 1998).

Dans le cadre de l'étude de complexes multiprotéiques, il serait tout à fait intéressant de réaliser diverses immunoprécipitations à l'aide d'anticorps dirigés contre les sous-unités d'un même complexe et de comparer les activités HATs des différents immunoprécipitats. Ces études permettraient d'identifier les interactants des HATs déterminants pour l'exercice de l'activité HAT. Le rôle de TRRAP pourrait se limiter à recruter différentes activités HATs au niveau de promoteurs. Cependant, cette protéine pourrait également inhiber ou activer certaines activités HATs dans certaines situations.

1.4.1.2 – Les deux HATs GCN5 et TIP60 requises pour activer la transcription de certains gènes

Comme nous l'avons exposé en introduction, TRRAP est une protéine déterminante pour le recrutement des HATs GCN5 et TIP60 au niveau de promoteurs de gènes à transcrire.

Lorsque nous avons étudié l'activation de la transcription par VP16 ou par les œstrogènes (parties Résultats I et II), nous avons souligné l'importance des cofacteurs TRRAP et GCN5. GCN5 n'est pas l'unique HAT impliquée dans ces deux processus, et divers groupes ont montré que l'HAT TIP60 intervient également dans l'activation de la transcription par VP16 et par les œstrogènes. TIP60 se fixe en effet au niveau du promoteur du gène activé par VP16 (Memedula and Belmont, 2003) ou de celui activé par les récepteurs aux œstrogènes (Metivier et al., 2003).

D'autres exemples attestent de la nécessité des deux activités HATs liées à TRRAP pour activer la transcription. Lors de l'activation de la transcription, les complexes TIP60 et hGCN5/PCAF sont essentiels à l'activation de la transcription par c-myc (Frank et al., 2003). De même, la transcription par E2F requiert les deux types d'activités (Taubert et al., 2004).

TRRAP est liée à deux activités HATs complémentaires, celles de TIP60 et de GCN5. Il serait intéressant de savoir si TRRAP peut interagir à la fois avec GCN5 et TIP60. Pour cela, il faut délimiter les domaines de TRRAP utiles à l'interaction avec GCN5 (déjà connu, GCN5 lie le domaine C-terminal de TRRAP) et avec TIP60.

1.4.1.3 – Modèle de recrutement des HATs GCN5 et TIP60 sur différents promoteurs

Après avoir découvert que TRRAP est à l'origine du recrutement des activités HAT de GCN5 et TIP60 sur certains promoteurs (Frank et al., 2003 ; McMahon et al., 2000), nous nous sommes demandé si ces deux types d'activités HATs étaient requises ensemble ou séquentiellement pour activer la transcription.

Plusieurs études illustrent le recrutement de ces cofacteurs *in vivo*. Seuls deux modèles sont décrits : ils correspondent aux systèmes d'activation de la transcription utilisés dans cette thèse.

Le premier modèle concerne l'activation de la transcription par VP16 (Memedula and Belmont, 2003). Tandis que TRRAP se fixe précocément, 5 minutes après l'ajout de VP16, GCN5 et TIP60 se fixent plus tardivement sur le promoteur. Le recrutement des HAT GCN5 et TIP60 coïncide particulièrement bien avec l'acétylation des histones H4 et H3 sur ce promoteur. Ces études suggèrent que TRRAP se fixe précocément sur le promoteur, et recrute par la suite ses partenaires HATs, GCN5 et TIP60.

Il serait nécessaire de réaliser cette même expérience dans des cellules où l'expression de TRRAP est inhibée, pour vérifier si c'est TRRAP qui est responsable du recrutement de GCN5 et TIP60. Si ces cellules présentent une incapacité à recruter les HATs ainsi qu'à acétyler les histones, c'est donc que TRRAP est nécessaire au recrutement des HATs au niveau de certains promoteurs.

Il serait également très intéressant de savoir si GCN5 et TIP60 sont recrutées seules ou accompagnées d'autres sous-unités des complexes TFTC ou TIP60. Ceci peut être facilement analysable grâce à l'utilisation d'anticorps ciblant différentes sous-unités des complexes.

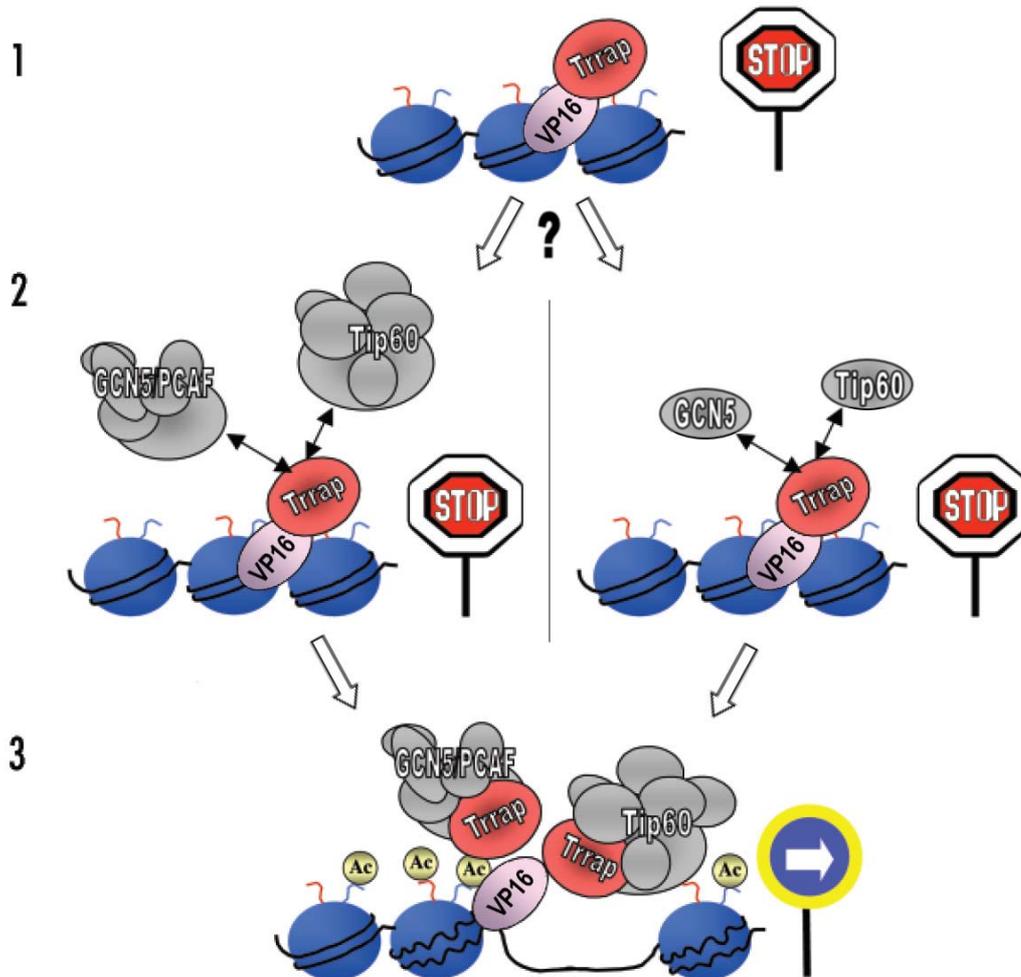


Figure 39 : Modèle de recrutement de TRRAP et des HATs lors de l'activation de la transcription par VP16 et par les œstrogènes.

Modèle construit à partir des études de (Memedula and Belmont, 2003). Tandis que TRRAP (en rouge) arrive précocement au niveau du promoteur, les HATs qui lui sont liées, TIP60 et GCN5 (en gris) arrivent plus tardivement. Cependant, ces études n'ont pas permis de déterminer si TIP60 et GCN5 arrivaient seuls ou assemblés en complexes au niveau du promoteur. De même, il n'est pas certain que TRRAP soit uniquement responsable du recrutement des HATs TIP60 et GCN5.

Les panneaux stop représentent la transcription inactive, alors que la flèche indique que la transcription est active.

Le deuxième modèle présenté est celui de l'activation de la transcription par les œstrogènes (Métivier et al., 2003). Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine menées par Métivier et al. ont montré que TIP60 se fixe avant GCN5 au niveau du promoteur pS2. Nos propres expériences aboutissent à la conclusion que TRRAP se fixe précocement au niveau du promoteur pS2 dans un intervalle de temps qui se rapproche de celui de TIP60. Cependant, ces expériences sont difficilement comparables car elles ont été réalisées dans des conditions différentes, et ne nous permettent pas de savoir si TRRAP se fixe avant ou bien en même temps que la protéine TIP60.

Par ailleurs, les études de Métivier et al. montrent que GCN5 se fixe plus tardivement que TIP60 au niveau de pS2. Les double-ChIP indiquent que GCN5 et TIP60 ne se fixent pas ensemble au niveau du promoteur pS2. Par contre, GCN5 se fixe en même temps que TAF1 et TAF4. Dans notre étude, TAF10 se fixe plus tardivement que TRRAP. Le scénario proposé

est le suivant : dans un premier temps, TRRAP se fixe sur le promoteur précocément, comme TIP60, et dans un deuxième temps GCN5 est recrutée en association avec les TAFs. Selon ce modèle, le complexe TFTC entier s'assemble au niveau du promoteur.

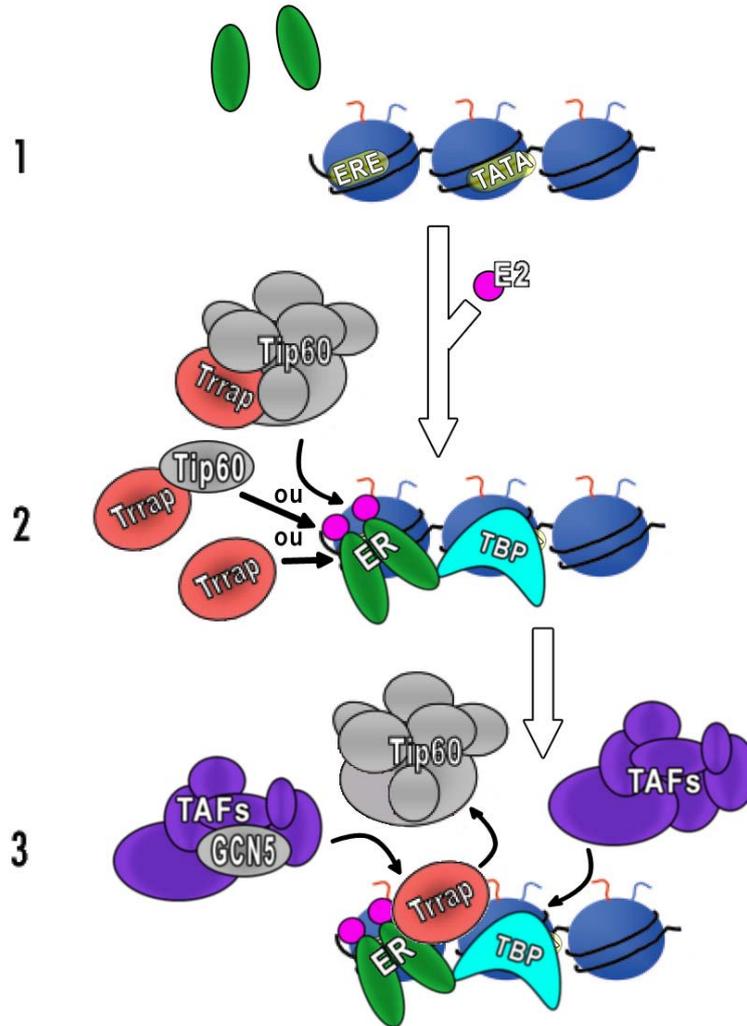


Figure 40 : Modèle de recrutement de TRRAP et des HATs au niveau du promoteur pS2, d'après la partie résultats de la présente thèse et (Metivier et al., 2003).

Le **panel 1** représente l'état du promoteur inactif, la chromatine est condensée. Le récepteur (vert) aux œstrogènes est représenté non fixé au niveau de sa séquence d'ADN ERE. Le **panel 2** représente l'état du promoteur 15' après ajout d'œstrogène (E2). Nos résultats ont montré que TRRAP est déjà fixé au promoteur pS2 à ce stade. D'après les études de Métivier et *al.*, TIP60 arrive également précocement au niveau du promoteur pS2, mais il est difficile de comparer les cinétiques qui proviennent de différentes expériences. C'est pourquoi nous ne pouvons pas savoir si TRRAP arrive avec TIP60. Dans le cas où TRRAP et TIP60 se fixent indépendamment, nous ne pouvons connaître l'ordre d'intervention de ces facteurs. A ce stade, TBP est déjà fixé au niveau de la boîte TATA du promoteur, tandis que les TAFs ne sont pas encore fixées. Le **panel 3** représente l'état du promoteur 45' après ajout du ligand. Cette étape est marquée par l'arrivée des TAFs et de GCN5 au niveau du promoteur, tandis que TIP60 n'y est plus présent. Les études de Métivier et *al.* montrent que TIP60 et GCN5 se fixent à des temps différents au niveau du promoteur pS2. Il est possible que les complexes TFTC et TFIID se forment au niveau du promoteur pS2 à cette étape. Suite à cette étape, TRRAP quitte le promoteur 1h après ajout du ligand, alors que les TAFs et TBP y sont toujours présents.

Alors que TIP60 et GCN5 se fixent en même temps au promoteur du gène activé par VP16, ces deux protéines se fixent séquentiellement et indépendamment sur le promoteur pS2 répondant aux œstrogènes. Aucune règle concernant l'ordre d'arrivée de TIP60 et GCN5 n'a été mise en évidence, et il est tout à fait vraisemblable que cet ordre varie en fonction du promoteur et de son environnement.

Si TRRAP constitue une plateforme pour recruter par la suite les HATs GCN5 et TIP60 et les TAFs, c'est que cette protéine est particulièrement labile au sein des complexes TIP60 et TFTC. TRRAP pourrait constituer un module détachable du complexe TFTC, reliant à la fois les activateurs, les protéines douées d'activités HATs, et les TAFs.

1.4.2 – Activités HATs liées à TRRAP et p300

Les modifications post-traductionnelles des histones se combinent pour aboutir à un profil particulier. Selon le « code des histones », chaque combinaison peut conduire à des effets différents.

Les HATs associées à TRRAP ne sont pas les seules requises lors de l'activation de la transcription. D'autres HATs, telles que TAF1, p300, PCAF, et sans doute des HATs non encore identifiées, sont nécessaires pour aboutir à un profil d'acétylation précis.

La plupart des travaux fonctionnels sur TRRAP relatent par ailleurs de la nécessité de l'HAT p300/CBP pour activer la transcription :

- TRRAP et p300/CBP, coactivateurs importants de la transcription activée par E2F (Fry et al., 1999 ; Martinez-Balbas et al., 2000 ; Taubert et al., 2004).
- TRRAP et p300/CBP, coactivateurs importants de la transcription activée par p53 (An et al., 2004; Ard et al., 2002 ; Ito et al., 2001 ; Wang et al., 2001b) ;
- TRRAP et p300/CBP, coactivateurs importants de la transcription activée par c-myc et E1A (Lang and Hearing, 2003 ; Liu et al., 2003b ; Nikiforov et al., 2002; Vervoorts et al., 2003) ;

Ces exemples marquent l'importance de TRRAP conjointement à p300/CBP pour conduire à l'activation de la transcription. Ainsi pour activer la transcription de certains gènes, le rassemblement de plusieurs protéines douées d'activité HATs est requise : GCN5, TIP60 et p300. Ces HATs peuvent avoir des fonctions qui se complètent et parmi les exemples ci-dessus, p300 peut acétyler directement les activateurs (Ito et al., 2001 ; Trouche et al., 1996).

Les résultats présentés dans la publication n°1 ont montré que p300 et GCN5 coopèrent pour activer la transcription par VP16. De plus, p300 est requise pour que TFTC ait un pouvoir activateur, *in vitro* sur une matrice d'ADN agencée en chromatine.

L'activation de la transcription par les œstrogènes requiert également la présence conjointe de GNC5 et p300 (résultats non montrés) pour l'activation optimale de la transcription.

Ainsi il est tout à fait probable que les fonctions de différentes HATs soient complémentaires, ce qui expliquerait pourquoi plusieurs d'entre elles sont conjointement requises pour activer la transcription de certains gènes.

La découverte d'une intervention précoce de p300, indispensable à l'action de TFIIIC me semble tout à fait intéressante. Après ces études, nous savons non seulement que la présence de p300 importe pour la fonction coactivatrice de TFIIIC, mais aussi que la fonction HAT de p300 est nécessaire. Ces expériences permettent de conclure que l'activité HAT de p300 participe à déclencher l'initiation de la transcription.

L'activité acétyltransférase de p300 cible divers substrats : outre les histones, il est possible que p300 acétyle des cofacteurs. Comme p300 est important pour la fonction coactivatrice de TFIIIC, on peut imaginer que p300 active le complexe TFIIIC en acétylant une ou plusieurs de ses sous-unités.

1.5 – TRRAP et la transcription, brève conclusion

TRRAP est retrouvée comme cofacteur lors de nombreux processus d'activation transcriptionnelle et :

- se lie à certains activateurs,
- peut recruter des protéines douées d'activité HAT,
- s'intègre à plusieurs complexes multiprotéiques impliqués dans la transcription (TFIIIC, STAGA, TIP60).

Pourtant, le rôle précis de cette protéine comme cofacteur n'a toujours pas été élucidé. Nous ne savons pas, par exemple, si TRRAP est douée d'une activité enzymatique particulière ou si elle subit des modifications post-traductionnelles.

Bien que TRRAP ne possède pas de domaine classique de liaison à l'ADN, il serait utile de savoir si TRRAP se lie à l'ADN, et si c'est le cas, de tenter de rechercher d'éventuelles séquences d'ADN cibles.

En ce qui concerne les activités HATs liées à TRRAP, nous avons montré qu'elles peuvent être modifiées en fonction de l'environnement protéique. Rien n'exclut cependant que TRRAP soit fixée à d'autres HATs, hormis GCN5 et TIP60. Une étude a d'ailleurs suggéré que TRRAP pourrait lier un complexe HAT ciblant H4 différent de TIP60, mais la sous-unité catalytique n'a pas été identifiée (Park et al., 2002). L'identification de nouveaux interactants de TRRAP doués d'activité HAT conforterait sa fonction de tremplin pour recruter ces mêmes HATs.

2 – TRRAP, IMPLICATION DANS LA REPARATION DES CASSURES D'ADN

2.1 – Intervention de la protéine TRRAP dans la réparation par NHEJ

Nous avons montré (partie III résultats) que TRRAP est directement connectée à un complexe impliqué dans la réparation des DSBs, le complexe MRN, et que cette interaction ne fait pas intervenir d'activité HAT. Par ailleurs, TRRAP s'intègre à un autre complexe impliqué dans la réparation des DSBs, le complexe TIP60 (Ikura et al., 2000; Kusch et al., 2004).

Nos résultats montrent que le complexe TRRAP/MRN isolé ici est distinct du complexe TIP60. En effet, la protéine TIP60 n'a pas été détectée dans les immunoprécipitats de MRN, et TRRAP/MRN est dénué d'activité HAT lors d'un test HAT réalisé *in vitro*, avec des histones libres. De même, TRRAP et MRN sont retrouvés dans les mêmes fractions lors d'un gradient de glycérol, et la coexpression de TRRAP et des trois sous-unités de MRN dans baculovirus permet la purification de MRN accompagné de TRRAP. L'interaction directe entre TRRAP et MRN est ainsi bien établie.

Comme le complexe MRN intervient en tant que détecteur des cassures double-brin et acteur dans la réparation par NHEJ, nous avons voulu savoir si TRRAP était impliquée dans ce processus.

Les études (partie III résultats) présentent plusieurs preuves de la participation de TRRAP au processus de réparation par NHEJ :

- 1 - tout d'abord, lors d'un test NHEJ, réalisé *in vitro*, sur de l'ADN non chromatinisé, les extraits déplétés en TRRAP sont déficients en NHEJ.
- 2 - de plus, des expériences de NHEJ *in vivo*, dans lesquelles la recircularisation du plasmide GFP coupé a été testée, ont montré que les cellules exprimant moins de TRRAP sont déficientes en efficacité de NHEJ.

Cette expérience comporte plusieurs biais :

1°) la déplétion en TRRAP n'inhibe pas uniquement la réparation de l'ADN, mais aussi la transcription ;

2°) l'inhibition de TRRAP n'étant pas totale, et comme TRRAP est retrouvée au sein de nombreux complexes multiprotéiques, la présence de TRRAP au sein du complexe MRN doit être faiblement réduite.

Pour répondre à ces différentes critiques, plusieurs stratégies ont été adoptées :

1°) tout d'abord, nous avons directement isolé l'ADN plasmidique de GFP des cellules. Ces expériences ont révélé que l'inhibition de TRRAP provoque une diminution de l'efficacité de recircularisation.

2°) un système de KO conditionnel de TRRAP dans des cellules ES a été utilisé. La séquence GFP incluant un site de coupure pour I-SceI est par ailleurs exprimée d'une

manière stable dans ces cellules. La capacité à recirculariser le plasmide GFP en conservant le site de coupure *I-SceI* déterminera l'efficacité de NHEJ précis. Or, lorsque l'expression de TRRAP est inhibée, ce processus est diminué d'un facteur de deux.

Ces résultats établissent l'implication de TRRAP dans la réparation des DSBs par NHEJ. Cependant, l'absence de TRRAP diminue l'efficacité du NHEJ sans l'inhiber complètement et nous ne connaissons pas le rôle précis de TRRAP accompagné de MRN dans le NHEJ.

La résolution de la structure du dimère MRE11-NBS1 a beaucoup apporté à la compréhension des fonctions de ces protéines dans le NHEJ. Si la résolution de la structure du complexe MRN entier liant TRRAP pouvait être menée à bien, cela permettrait de savoir si TRRAP se lie à la tête du complexe, qui comprend les activités catalytiques, ou si TRRAP se lie à la queue de la protéine RAD50, qui peut relier deux brins d'ADN.

D'autres propositions seraient intéressantes à tester pour attribuer un rôle plus précis à TRRAP dans la réparation.

Tout d'abord, la liaison de TRRAP au niveau d'extrémités d'ADN pourra être testée. Comme TRRAP est plus spécifiquement impliquée dans la réparation précise de cassures d'ADN par NHEJ, il est possible que TRRAP ne reconnaisse qu'un type d'extrémité d'ADN. Les expériences de liaison de TRRAP à l'ADN devront donc être réalisées à l'aide de divers substrats d'ADN, à bout francs (3' ou 5' sortant, avec ou sans microhomologies).

Le complexe MRN est également impliqué dans d'autres processus de réparation, comme la recombinaison homologue. L'intervention de TRRAP dans ce processus demande à être testée. Chez la levure, des ChIPs au niveau d'un site d'ADN coupé ont permis de visualiser différents acteurs de la recombinaison homologue (Wolner et al., 2003). L'homologue de TRRAP, Tra1, se lie-t-il spécifiquement à cet ADN coupé ?

De nombreuses questions restent en suspens. Notre découverte de l'implication de TRRAP dans la réparation par NHEJ est une nouveauté. Nous espérons qu'à la suite de cette étude, TRRAP sera étudiée comme acteur des différents processus de réparation, au même titre que les protéines du complexe MRN.

A l'inverse, il n'est pas exclu que le complexe MRN participe à la transcription. Les études qui montrent que certains facteurs sont impliqués à la fois dans la réparation et dans la transcription, sont en effet de plus en plus nombreuses, montrant que ces processus sont très imbriqués.

2.2 – Intervention indirecte de la protéine TRRAP dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN

2.2.1 – TRRAP recrute les activités HATs au niveau des sites de cassures

2.2.1.1 – TRRAP/MRN dépourvu d'activité HAT

TRRAP s'intègre à des complexes multiprotéiques doués ou dépourvus d'activité HAT.

Aucune activité HAT n'est associée à MRN/TRRAP lorsqu'un test HAT est réalisé *in vitro* sur des histones libres (partie III Résultats). Le même type d'expérience a été mené avec des histones agencés en nucléosomes, et dans ce cas également, aucune activité HAT n'a été détectée dans les immunoprécipitats de NBS1 ou de MRE11 (résultats non montrés).

Ces résultats confirment que MRN/TRRAP forme un module distinct du complexe TIP60. Cependant, ces tests HAT ont comme inconvénient d'avoir été réalisés *in vitro*, avec du matériel immunoprécipité à partir de cellules HeLa et ne reflètent pas la situation *in vivo*. En effet, *in vitro* plusieurs paramètres sont modifiés par rapport au contexte cellulaire, tels que la proportion de variants d'histones et l'état des cellules. Or, ces paramètres sont particulièrement critiques pour étudier la réparation des DSBs. Il est connu que suite à l'induction de DSBs, l'histone variant H2AX est spécifiquement phosphorylé. Il serait intéressant de réaliser ces tests HATs avec des cellules soumises à irradiation. L'hypothèse selon laquelle TRRAP/MRN est d'abord dépourvu d'activité HAT, puis recrute ce type d'activité après induction de DSBs est très séduisante.

Le complexe NuA4, n'est recruté qu'en présence de H2A phosphorylé suite à l'induction de DSBs (Bird et al., 2002; Downs et al., 2004). Il se peut que TRRAP/MRN ne soit associé à une activité HAT qu'en présence de DSBs. Cette hypothèse reste toutefois à tester.

2.2.1.2 – TRRAP au sein de complexes HATs impliqués dans la réparation de l'ADN

Si nous n'avons pas détecté d'activité HAT lié au module TRRAP/MRN, TRRAP est par ailleurs associée à d'autres complexes impliqués dans la réparation, qui eux, sont associés à une activité HAT. Citons, le complexe TFTC, impliqué dans la réparation des cassures simple-brin, et le complexe TIP60 (NuA4 chez la levure), impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

TFTC se fixe avec plus d'affinité à l'ADN soumis aux UV qu'à l'ADN non soumis au UV, et acétyle préférentiellement les histones assemblées à partir d'ADN soumis au UV. Ces expériences ont été réalisées avec du TFTC purifié, qui contient la protéine TRRAP. Il est possible que TRRAP intervienne dans une des étapes de ce processus (recrutement de GCN5, reconnaissance des histones dont l'ADN est cassé, etc...). Brand et *al.* suggèrent que TFTC

acétyle les histones, facilitant alors le recrutement de la machinerie de réparation sur l'ADN endommagé. Selon cette hypothèse, TFIC interviendrait au début du processus de réparation.

En ce qui concerne le complexe TIP60, l'activité HAT de TIP60 est importante pour réparer les DSBs (Ikura et al., 2000), et chez la levure, la complexe NuA4 est spécifiquement recruté au niveau de H2A phosphorylé (au niveau de cassures d'ADN double-brin) (Downs et al., 2004). Chez la Drosophile, l'équivalent du complexe NuA4 acétyle spécifiquement le variant H2Av phosphorylé et facilite l'échange du dimère H2Av-H2B en un dimère non modifié (Kusch et al., 2004). Dans ce cas, TIP60 est susceptible d'intervenir à différentes étapes du processus de réparation, et notamment à la fin, pour restaurer le contexte nucléosomal d'origine.

Diverses HATs liées à TRRAP sont impliquées dans la réparation des cassures d'ADN. Mais le rôle dans la réparation de TRRAP liée à ces HATs n'a toutefois jamais été clarifié.

Il serait intéressant de réaliser des tests HATs avec des immunoprécipitats de TRRAP qui proviennent de cellules soumises à l'irradiation ou aux UV. Cela permettrait de voir si l'activité HAT liée à TRRAP est modifiée (intensité, spécificité de substrat) lors des différents processus de réparation.

2.2.1.3 – Modèle d'intervention de TRRAP dans la réparation des DSBs

Ainsi, lors du processus de réparation des DSBs, TRRAP est susceptible d'intervenir à la fois dans des complexes dépourvus d'activité HAT (p400, MRN) et dans des complexes doués de cette activité. Ces résultats peuvent paraître incompatibles au premier abord, mais si on les replace dans un contexte cellulaire, ils peuvent au contraire être complémentaires. En effet, nous pouvons imaginer qu'en premier lieu, TRRAP reconnaît les sites de cassures, puis s'y fixe, seul ou avec MRN, et ne recrute qu'ensuite les HATs telles que TIP60. Ceci serait à vérifier à l'aide d'expériences de CHIP *in vivo*, réalisées après coupure de l'ADN (comme dans (Wolner et al., 2003)), pour visualiser l'ordre d'intervention des facteurs impliqués dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Le fait que TRRAP puisse reconnaître les sites de cassure est appuyé par une possible interaction entre le domaine BRCT de NBS1 et TRRAP (Dr S.Kato, Tokyo, communication personnelle). Ce domaine BRCT est par ailleurs capable de reconnaître le variant H2AX phosphorylé, localisé au niveau des sites de cassures. Il est probable que TRRAP soit impliquée dans la reconnaissance des sites de cassures d'ADN.

Ce modèle d'une fixation précoce de TRRAP sans HAT, suivie d'un recrutement de facteurs doués d'activité HAT, est comparable au modèle proposé lors du processus d'activation de la transcription par VP16 (Memmedula and Belmont, 2003).

2.2.2 – TRRAP dans les cascades de signalisation suite à l'induction de cassures

2.2.2.1 – TRRAP impliquée dans les mêmes voies de signalisation que MRN ?

Outre son rôle direct dans la réparation des DSBs, le complexe MRN constitue un détecteur des dommages, capable de bloquer le passage de la phase G2 à la mitose par la voie de signalisation ATM/Chk2 (Carson et al., 2003). Il est possible que TRRAP soit impliquée dans la même cascade de signalisation que MRN. D'ailleurs, les cellules KO TRRAP chez la souris présentent un défaut de régulation du point de contrôle G2/M (Herceg et al., 2001 ; Herceg et al., 2003).

Par ailleurs, les KO TRRAP chez la souris aboutissent à une ségrégation défectueuse des chromosomes, due à un défaut du point de contrôle mitotique (Li et al., 2004).

Ces études ont maintenant clairement établi que TRRAP est un acteur important du cycle cellulaire (Herceg and Wang, 2005). Toutefois, des études restent à mener pour voir si TRRAP intervient précisément dans les mêmes voies de signalisation que le complexe MRN.

Certains domaines de TRRAP (FAT, FATC, domaine catalytique) comportent d'importantes homologies de séquences avec les ATM et ATR. Il est plus probable que TRRAP intervienne dans les mêmes voies de signalisation que les ATMs que dans celles du complexe MRN.

2.2.2.2 – TRRAP impliqué dans les même voies de signalisation que les ATM ?

2.2.2.2.1 – *TRRAP et ATM partagent des interactants*

Très homologues aux protéines ATM, la protéine hTRRAP est dotée comme les ATM de domaines FAT et FATC de fonctions inconnues, et d'un domaine PI3 kinase. Toutefois, le domaine kinase de TRRAP n'est pas fonctionnel et TRRAP ne peut pas s'autophosphoryler *in vitro*. Par contre, hTRRAP conserve les domaines des ATM FAT et FATC qui peuvent être impliqués dans la reconnaissance d'autres protéines.

Certains substrats de phosphorylation par ATM interagissent avec la protéine hTRRAP.

Premièrement, ATM phosphoryle p53 suite à l'induction de cassures DSBs, ce qui active la transcription par p53. Or la protéine hTRRAP est un cofacteur lors de l'activation de la transcription par p53 (Barlev et al., 2001). p53 semble même directement responsable du recrutement de TRRAP sur le promoteur du gène *mdm2* (Ard et al., 2002).

Deuxièmement, ATM phosphoryle E2F1. Or les complexes TIP60, incluant la protéine TRRAP, sont requis lors de l'activation de la transcription par E2F (Taubert et al., 2004).

Enfin ATM reconnaît, puis phosphoryle, la protéine BRCA1. Or hTRRAP pourrait interagir *in vitro* avec BRCA1 (S.Kato, Univ. Tokyo, résultats non publiés).

Ainsi, il est fort probable que la protéine TRRAP partage certains interactants avec ATM.

2.2.2.2.2 – TRRAP et ATM : interactants communs, mais fonctions différentes ?

Si TRRAP et ATM ont des partenaires en commun, elles ne partagent pas obligatoirement les mêmes fonctions. Il est possible d'imaginer qu'au contraire, TRRAP adopte une structure tridimensionnelle qui ressemble à celle des ATM (du moins au niveau du site de fixation des substrats), tout en étant dépourvue d'activité kinase. TRRAP pourrait interagir avec les cibles de phosphorylation d'ATM, mais sans les phosphoryler, et TRRAP constituerait une sorte de « dominant négatif » des ATMs. Cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine TRRAP et par des expériences de mutagenèse dirigée. Par la suite, des expériences d'interaction entre TRRAP et les cibles des ATM pourront être menées. Il serait intéressant de voir si TRRAP et ATM sont en compétition pour lier BRCA1, p53 ou E2F1 *in vivo*.

2.2.2.2.3 – Interdépendance ATM/TRRAP

TRRAP et ATM sont toutes deux impliquées dans la réparation après induction de DSBs. Ces protéines partagent par ailleurs des partenaires communs ; il est possible que leur fonction dépende l'une de l'autre.

Nous supposons d'abord qu'ATM influence TRRAP, par exemple en l'activant par phosphorylation. Le résidu phosphorylé suite à l'autoactivation des ATM, la Ser1981, n'est pas conservée dans le domaine ATM de TRRAP (Bakkenist and Kastan, 2003 ; Bosotti et al., 2000). Ainsi, il est peu probable qu'ATM phosphoryle TRRAP au niveau de cette région. ATM pourrait phosphoryler d'autres régions de TRRAP, ce qui reste à étudier.

Nous avons supposé dans un deuxième temps que TRRAP influence l'activité kinase des ATM. Des expériences ont été réalisées au laboratoire pour tester cette hypothèse. Nous avons comparé l'intensité de phosphorylation de NBS1 et H2AX dans des cellules normales avec celle de cellules où l'expression de TRRAP est inhibée, après induction de dommages d'ADN au MMS. Aucune différence drastique n'a été détectée au niveau de la phosphorylation de NBS1 ou H2AX entre les cellules normales ou celles contenant moins de TRRAP (résultats non montrés). Ces expériences suggèrent que TRRAP n'influence pas la phosphorylation de NBS1 et H2AX par les protéines ATM.

Ainsi, rien ne démontre que les fonctions d'ATM et de TRRAP s'influencent directement l'une l'autre.

Cependant, les expériences décrites ci-dessus n'excluent pas que TRRAP soit impliquée dans les voies de signalisation en aval des ATM, suite à la phosphorylation de NBS1 et de H2AX.

Si TRRAP interagit spécifiquement avec les partenaires d'ATM qui sont phosphorylés, cela expliquerait pourquoi TRRAP interviendrait en aval d'ATM.

Par ailleurs, TRRAP peut se lier au domaine BRCT (S.Kato, Univ Tokyo, résultats non publiés), qui, lui, est spécifiquement impliqué dans la reconnaissance de sites phosphorylés par ATM (Manke et al., 2003). Il est envisageable que TRRAP interagisse

spécifiquement avec les substrats phosphorylés d'ATM, par l'intermédiaire de protéines possédant un domaine BRCT, comme NBS1. De manière à savoir si TRRAP est plus affine pour les substrats d'ATM sous leur forme phosphorylée plutôt que non phosphorylée, il serait intéressant de mener des expériences d'interaction entre protéines.

2.2.2.2.4 – TRRAP et la régulation du point de contrôle mitotique et G2/M

Les ATM et ATR sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et participent à différents points de contrôle du cycle cellulaire.

L'absence de TRRAP provoque un défaut au niveau des points de contrôle G2/M et pendant la mitose (Herceg et al., 2001 ; Herceg et al., 2003 ; Li et al., 2004). L'absence de TRRAP provoque aussi une dérégulation de la mitose qui a été corrélée à une modulation de l'expression des protéines Mad1 et Mad2 (Li et al., 2004). Par contre, nous ne connaissons pas les voies de signalisation dans lesquelles TRRAP s'implique pour contrôler le passage de la phase G2 à la phase M.

Après induction de cassures double-brin de l'ADN, les ATM et ATR sont activées, et phosphorylent les kinases Chk1 et Chk2, ce qui inhibe la phosphorylation des cyclines CDC25C et CDC25A, et conduit au blocage des cellules au niveau du point de contrôle G2/M (Iliakis et al., 2003)(Figure 41). La kinase CDK1 joue un rôle important dans le point de contrôle G2/M (Morgan, 1995).

Il serait intéressant de tester l'implication de la protéine TRRAP dans les différentes voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de CDK1 : ATM-CHK2-CDC25A-CDK2 et ATR-CHK1-CDC25C-CDK1. Herceg et *al.* ont observé que l'activité de CDK1 est diminuée en l'absence de TRRAP (Herceg et al., 2001), ce qui implique probablement TRRAP dans cette voie de signalisation.

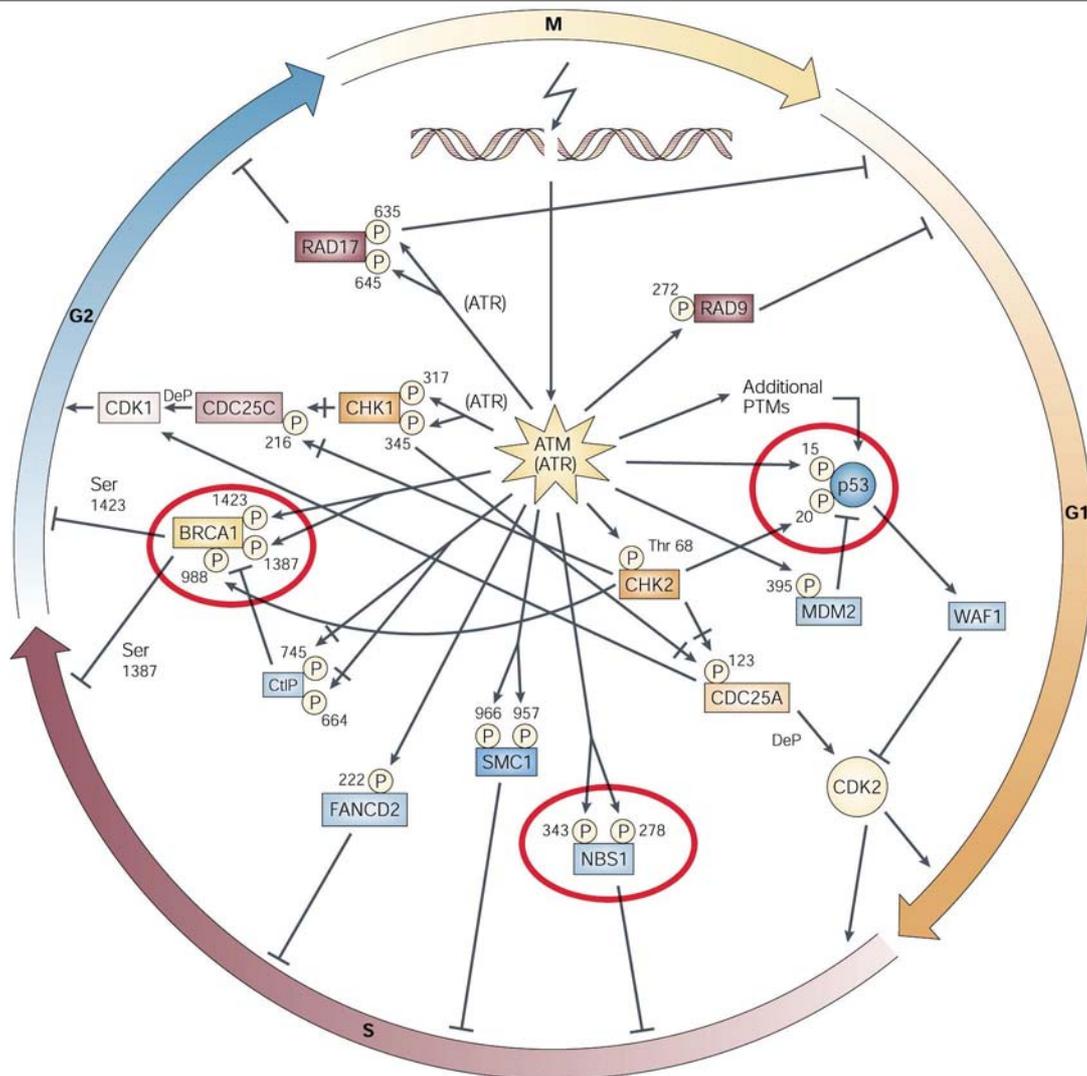


Figure 41 : Les ATMs activent les points de contrôle du cycle cellulaire après induction de DSBs, d'après (Shiloh, 2003)

Les partenaires probables de la protéine TRRAP sont entourés en rouge. Il est possible que TRRAP soit impliquée dans les mêmes voies de signalisation que les ATMs. Il serait intéressant de tester l'implication de TRRAP dans la voie de signalisation CHK1-CDC25C-CDK1. Les flèches indiquent une activation, tandis que les formes en « T » indiquent une inhibition. Les flèches coupées par une ligne indiquent une inhibition de la phosphorylation.

2.2.3 – TRRAP impliquée dans les mêmes voies de signalisation que p53 ?

Suite à l'induction de DSBs, la protéine p53 est phosphorylée par ATM et est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Iliakis et al., 2003).

De nombreux indices font penser que, lors de la réponse cellulaire suite à l'induction de dommages à l'ADN, les fonctions de p53 et de TRRAP s'imbriquent.

Tout d'abord, les cellules déficientes en p53 présentent le phénomène d'endoréplication, comme les cellules KO pour TRRAP (Cross et al., 1995 ; Di Leonardo et al., 1997). Ceci suggère que TRRAP et p53 soient impliquées dans les mêmes voies de signalisation.

De plus, l'acétylation de p53, induite par les cassures d'ADN, conduit au recrutement de la protéine hTRRAP au niveau de promoteur p21, régulé par p53 (Barlev et al., 2001). hTRRAP pourrait donc jouer un rôle dans la transcription de certains gènes dont l'expression serait induite par p53 à la suite de cassures de l'ADN.

TIP60 est également requise pour activer la transcription par p53 (Legube et al., 2004). Il est possible que TRRAP avec TIP60 s'impliquent conjointement dans la régulation de la transcription de ces gènes.

Enfin, suite à l'induction de dommages à l'ADN, p300 et PCAF/Gcn5 acétylent p53 (Schiltz and Nakatani, 2000). hTRRAP pourrait aussi intervenir à ce niveau, pour recruter l'activité HAT Gcn5 qui acétylerait p53, lui permettant d'activer la transcription.

Plusieurs perspectives sont envisageables pour l'étude du rôle de TRRAP lors de l'activation de la transcription par p53 après irradiation. Nous pourrions tout d'abord tester si TRRAP et p53 se colocalisent suite à l'irradiation de cellules. Ensuite, il serait intéressant de tester l'état d'acétylation de p53 dans des KO pour TRRAP. Enfin, des études de CHIP au niveau du promoteur p21, réalisées avec des cellules normales et KO pour TRRAP permettraient de savoir si TRRAP est impliquée dans le recrutement de TIP60 après irradiation.

2.2.4 – L'intervention de TRRAP dans la réparation n'exclut pas une implication de TRRAP dans la régulation transcriptionnelle suite à l'induction de DSBs

Comme nous l'avons vu, TRRAP intervient directement dans la réparation des DSBs par NHEJ *in vitro*, mais elle est très probablement aussi impliquée indirectement dans les voies de signalisation provoquées par l'irradiation.

Ces données n'excluent pas que TRRAP active la transcription de gènes spécifiques après induction de cassures. D'ailleurs, comme nous l'avons vu, TRRAP intervient dans l'activation de la transcription avec p53 suite à l'induction de cassures.

3 – BILAN, TRRAP AU SEIN DE MULTIPLES COMPLEXES

Tout au long de cette thèse, TRRAP a été retrouvée au sein de multiples complexes de protéines impliqués dans la transcription, la réparation de l'ADN, ou encore le contrôle du cycle cellulaire.

Nous avons montré notamment que TRRAP interagit spécifiquement avec le complexe MRN et qu'elle est impliquée dans la réparation des DSB par le processus de NHEJ. Par ailleurs, les résultats de la présente thèse attestent que TRRAP fonctionne comme coactivateur lors de l'activation de la transcription par VP16 ou par les œstrogènes.

Que ce soit lors de la transcription ou de la réparation de l'ADN, il est possible que TRRAP se fixe précocément (au niveau de promoteurs ou de sites de cassures) sans protéine HAT, et provoque par la suite le recrutement de facteurs doués d'activité HAT, comme nous l'avons proposé dans différents modèles. L'action de TRRAP après activation de la transcription, et celle après induction de DSB, peuvent se ressembler. Si les processus de transcription et de réparation de l'ADN ont été décrits comme distincts, nous savons maintenant que moult facteurs de transcription participent aussi à la réparation de l'ADN. Transcription et réparation de l'ADN peuvent maintenant être considérés comme des processus imbriqués.

TRRAP compte d'abondants interactants ; il est tout à fait vraisemblable que cette protéine de grande taille se charge de recruter et de regrouper certaines protéines, et le rôle de « **plateforme** d'interactions entre protéines » attribué à TRRAP me semble tout à fait justifié. Si TRRAP constitue un tremplin pour recruter les HATs au niveau du promoteur, cela suggère que cette protéine se détache facilement des complexes et reste mobile dans les cellules. Des études par immunofluorescence (FRET) seraient peut-être la méthode la plus adaptée pour étudier la localisation de sous-unités de mêmes complexes protéiques : sous quel stimuli, dans quel état cellulaire les composants d'un même complexe interagissent-ils ? Petit à petit, de telles études permettraient de comprendre comment les protéines s'agencent en édifices stables.

D'autre part, si TRRAP est une sous-unité labile et qu'elle compte autant de partenaires protéiques, c'est que cette protéine est probablement elle-même régulée. La recherche systématique de modifications post-traductionnelles appliquées au niveau de TRRAP ainsi que des enzymes la modifiant est une entreprise nécessaire pour rechercher les voies de signalisation dans lesquelles TRRAP peut être impliquée.

Enfin, TRRAP est impliquée dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Il serait intéressant de tester la modulation des activités HATs liées à TRRAP tout au long du cycle, et de tester si ces activités sont modifiées lors de l'induction de cassures d'ADN.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abmayr, S.M., Workman, J.L. and Roeder, R.G. (1988) The pseudorabies immediate early protein stimulates in vitro transcription by facilitating TFIID: promoter interactions. *Genes Dev*, **2**, 542-553.
- Abraham, R.T. (2003) Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *Bioessays*, **25**, 627-630.
- Acevedo, M.L. and Kraus, W.L. (2003) Mediator and p300/CBP-steroid receptor coactivator complexes have distinct roles, but function synergistically, during estrogen receptor alpha-dependent transcription with chromatin templates. *Mol Cell Biol*, **23**, 335-348.
- Acevedo, M.L. and Kraus, W.L. (2004) Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem*, **40**, 73-88.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. and Thanos, D. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, **103**, 667-678.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F.X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J.A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L.L., Ducommun, B., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998) Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature*, **396**, 184-186.
- Akhtar, A. and Becker, P.B. (2000) Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell*, **5**, 367-375.
- Akhtar, A. and Becker, P.B. (2001) The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep*, **2**, 113-118.
- Albright, S.R. and Tjian, R. (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, **242**, 1-13.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L. and Cote, J. (1999) NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *Embo J*, **18**, 5108-5119.
- An, W., Kim, J. and Roeder, R.G. (2004) Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*, **117**, 735-748.
- Anderson, J.D., Lowary, P.T. and Widom, J. (2001) Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*, **307**, 977-985.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., Larsson, L.G. and Wright, A.P. (2005) c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*, **7**, 303-310.
- Ard, P.G., Chatterjee, C., Kunjibettu, S., Adside, L.R., Gralinski, L.E. and McMahon, S.B. (2002) Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol*, **22**, 5650-5661.
- Arthur, L.M., Gustausson, K., Hopfner, K.P., Carson, C.T., Stracker, T.H., Karcher, A., Felton, D., Weitzman, M.D., Tainer, J. and Carney, J.P. (2004) Structural and functional analysis of Mre11-3. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1886-1893.
- Aso, T., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1995) The RNA polymerase II elongation complex. *FASEB J*, **9**, 141-128.
- Assenmacher, N. and Hopfner, K.P. (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma*, **113**, 157-166.

BIBLIOGRAPHIE

- Asturias, F.J., Jiang, Y.W., Myers, L.C., Gustafsson, C.M. and Kornberg, R.D. (1999) Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science*, **283**, 985-987.
- Avantaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S. and Kelly, K. (1997) Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, **89**, 1175-1184.
- Baek, H.J., Malik, S., Qin, J. and Roeder, R.G. (2002a) Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF(II)s. *Mol Cell Biol*, **22**, 2842-2852.
- Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2002b) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell*, **110**, 55-67.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499-506.
- Balaguer, P., Boussioux, A.M., Demirpençe, E. and Nicolas, J.C. (2001) Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence*, **16**, 153-158.
- Banerjee, A.C., Recupero, A.J., Mal, A., Piotrkowski, A.M., Wang, D.M. and Harter, M.L. (1994) The adenovirus E1A 289R and 243R proteins inhibit the phosphorylation of p300. *Oncogene*, **9**, 1733-1737.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641-643.
- Barbaric, S., Walker, J., Schmid, A., Svejstrup, J.Q. and Horz, W. (2001) Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation--a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *Embo J*, **20**, 4944-4951.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, **8**, 1243-1254.
- Barlev, N.A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., Ying, C., Liu, L., Workman, J.L. and Berger, S.L. (1998) Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 1349-1358.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J. and Pugh, B.F. (2004) Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, **116**, 699-709.
- Belikov, S., Astrand, C., Holmqvist, P.H. and Wrangé, O. (2004) Chromatin-mediated restriction of nuclear factor 1/CTF binding in a repressed and hormone-activated promoter in vivo. *Mol Cell Biol*, **24**, 3036-3047.
- Bell, B., Scheer, E. and Tora, L. (2001) Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol Cell*, **8**, 591-600.
- Belotserkovskaya, R., Sterner, D.E., Deng, M., Sayre, M.H., Lieberman, P.M. and Berger, S.L. (2000) Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters. *Mol Cell Biol*, **20**, 634-647.
- Benecke, A., Gaudon, C., Garnier, J.M., vom Baur, E., Chambon, P. and Losson, R. (2002) ADA3-containing complexes associate with estrogen receptor alpha. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2508-2514.
- Bhaumik, S.R. and Green, M.R. (2001) SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev*, **15**, 1935-1945.
- Bhaumik, S.R. and Green, M.R. (2002) Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo. *Mol Cell Biol*, **22**, 7365-7371.

- Bhaumik, S.R., Raha, T., Aiello, D.P. and Green, M.R. (2004) In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev*, **18**, 333-343.
- Bird, A.W., Yu, D.Y., Pray-Grant, M.G., Qiu, Q., Harmon, K.E., Megee, P.C., Grant, P.A., Smith, M.M. and Christman, M.F. (2002) Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, **419**, 411-415.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. and Ozato, K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.*, **12**, 1638-1651.
- Bosotti, R., Isacchi, A. and Sonhammer, E.L. (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci*, **25**, 225-227.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M. and Luscher, B. (2001) Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev*, **15**, 2042-2047.
- Bouchard, V.J., Rouleau, M. and Poirier, G.G. (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol*, **31**, 446-454.
- Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S. and Cote, J. (2003) Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev*, **17**, 1415-1428.
- Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *Embo J*, **15**, 5093-5103.
- Bourbon, H.M., Aguilera, A., Ansari, A.Z., Asturias, F.J., Berk, A.J., Bjorklund, S., Blackwell, T.K., Borggrefe, T., Carey, M., Carlson, M., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Emmons, S.W., Fondell, J.D., Freedman, L.P., Fukasawa, T., Gustafsson, C.M., Han, M., He, X., Herman, P.K., Hinnebusch, A.G., Holmberg, S., Holstege, F.C., Jaehning, J.A., Kim, Y.J., Kuras, L., Leutz, A., Lis, J.T., Meisterernest, M., Naar, A.M., Nasmyth, K., Parvin, J.D., Ptashne, M., Reinberg, D., Ronne, H., Sadowski, I., Sakurai, H., Sipiczki, M., Sternberg, P.W., Stillman, D.J., Strich, R., Struhl, K., Svejstrup, J.Q., Tuck, S., Winston, F., Roeder, R.G. and Kornberg, R.D. (2004) A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell*, **14**, 553-557.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y. and Ogrzyzko, V. (1998) Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*, **396**, 594-598.
- Brady, M.E., Ozanne, D.M., Gaughan, L., Waite, I., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (1999) Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem*, **274**, 17599-17604.
- Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L. and Schultz, P. (1999a) 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.
- Brand, M., Yamamoto, K., Staub, A. and Tora, L. (1999b) Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J. Biol Chem.*, **274**, 18285-18289.

- Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J.M., Tora, L. and Chambon, P. (1993) Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.*, **12**, 489-499.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S. and Workman, J.L. (2001a) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, **292**, 2333-2337.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S. and Workman, J.L. (2001b) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, **292**, 2333-2337.
- Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1999) Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell*, **3**, 207-217.
- 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.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
- Bulger, M. and Groudine, M. (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*, **13**, 2465-2477.
- Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. and Magnuson, T. (2000) A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, **6**, 1287-1295.
- Burakov, D., Crofts, L.A., Chang, C.P. and Freedman, L.P. (2002) Reciprocal Recruitment of DRIP/Mediator and p160 Coactivator Complexes in Vivo by Estrogen Receptor. *J Biol Chem*, **277**, 14359-14362.
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev.*, **11**, 3020-3031.
- Burley, S.K. (1996) The TATA box binding protein. *Curr.Opin.Struct.Biol*, **6**, 69-75.
- Buscemi, G., Savio, C., Zannini, L., Micciche, F., Masnada, D., Nakanishi, M., Tauchi, H., Komatsu, K., Mizutani, S., Khanna, K., Chen, P., Concannon, P., Chessa, L. and Delia, D. (2001) Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol*, **21**, 5214-5222.
- Cairns, B.R., Kim, Y.J., Sayre, M.H., Laurent, B.C. and Kornberg, R.D. (1994) A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, |50-|54.
- Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. and Kornberg, R.D. (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **87**, 1249-1260.
- Candau, R. and Berger, S.L. (1996) Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. Evidence for an adaptor complex in vivo. *J.Biol Chem.*, **271**, 5237-5245.
- Candau, R., Zhou, J.X., Allis, C.D. and Berger, S.L. (1997) Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *EMBO J.*, **16**, 555-565.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.

- Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L. and Hansen, J.C. (1998) Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, **37**, 14776-14787.
- Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V. and Weitzman, M.D. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J*, **22**, 6610-6620.
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M.J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Eckhaus, M., Ried, T., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. (2003a) H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, **114**, 371-383.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. (2003b) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, **5**, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C. and Nussenzweig, A. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.
- Chakravarthy, S., Park, Y.J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R.S. and Luger, K. (2005) Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett*, **579**, 895-898.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H.Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1999) A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell*, **96**, 393-403.
- Chalkley, G.E. and Verrijzer, C.P. (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250- TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo J*, **18**, 4835-4845.
- Chan, D.W., Chen, B.P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J. and Chen, D.J. (2002) Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*, **16**, 2333-2338.
- Chan, H.M. and La Thangue, N.B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, **114**, 2363-2373.
- Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W. and Livingston, D.M. (2005) The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev*, **19**, 196-201.
- Chen, B.P., Chan, D.W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J. and Chen, D.J. (2005) Cell cycle dependence of DNA-PK phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999a) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, G., Yuan, S.S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S.P., Wu, Y., Arlinghaus, R., Baltimore, D., Gasser, P.J., Park, M.S., Sung, P. and Lee, E.Y. (1999b) Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem*, **274**, 12748-12752.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel

- histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Cheng, S.W., Davies, K.P., Yung, E., Beltran, R.J., Yu, J. and Kalpana, G.V. (1999) c-MYC interacts with IN11/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet*, **22**, 102-105.
- 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.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D. and Vandell, L. (2002) Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *Embo J*, **21**, 5457-5466.
- Chi, T., Lieberman, P., Ellwood, K. and Carey, M. (1995) A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature*, **377**, 254-257.
- Chiang, P.W. and Kurnit, D.M. (2003) Study of dosage compensation in Drosophila. *Genetics*, **165**, 1167-1181.
- Cho, E.J., Kobar, M.S., Kim, M., Greenblatt, J. and Buratowski, S. (2001) Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev*, **15**, 3319-3329.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y. and Reinberg, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **18**, 5355-5363.
- Choi, C.H., Burton, Z.F. and Usheva, A. (2004) Auto-acetylation of transcription factors as a control mechanism in gene expression. *Cell Cycle*, **3**, 114-115.
- Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C. and Dillon, N. (2005) Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep*, **6**, 354-360.
- Choy, J.S. and Kron, S.J. (2002) NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response. *Mol Cell Biol*, **22**, 8215-8225.
- Choy, J.S., Tobe, B.T., Huh, J.H. and Kron, S.J. (2001) Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. *J Biol Chem*, **276**, 43653-43662.
- Christova, R. and Oelgeschlager, T. (2002) Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol*, **4**, 79-82.
- Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J. and Pillus, L. (1999) Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **19**, 2515-2526.
- Clayton, A.L. and Mahadevan, L.C. (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett*, **546**, 51-58.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.D., van Driel, R. and Fakan, S. (1999) Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell*, **10**, 211-223.
- Coisy, M., Roure, V., Ribot, M., Philips, A., Muchardt, C., Blanchard, J.M. and Dantoni, J.C. (2004) Cyclin A repression in quiescent cells is associated with chromatin remodeling of its promoter and requires Brahma/SNF2alpha. *Mol Cell*, **15**, 43-56.
- Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A. and Parker, A.R. (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene*, **24**, 949-961.
- Conaway, J.W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Yao, T., Swanson, S.K., Banks, C.A., Washburn, M.P. and Conaway, R.C. (2005) The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett*, **579**, 904-908.
- Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu.Rev.Biochem.*, **62**, 161-190.

- Conaway, R.C., Kong, S.E. and Conaway, J.W. (2003) TFIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers. *Cell*, **114**, 272-274.
- Connelly, J.C., de Leau, E.S. and Leach, D.R. (2003) Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the E. coli SbcCD (MR) complex. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 795-807.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1037-1043.
- Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299-311.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L. and Peterson, C.L. (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, **265**, 53-60.
- Coulombe, B., Li, J. and Greenblatt, J. (1994) Topological localization of the human transcription factors IIA, IIB, TATA box-binding protein, and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter. *J Biol Chem*, **269**, 19962-19967.
- 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.
- Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S. and Khochbin, S. (1999) Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry*, **38**, 8826-8830.
- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.H. and Reid, B.J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, **267**, 1353-1356.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.
- Dantanel, 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.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W. and Richmond, T.J. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **319**, 1097-1113.
- Davidson, I. (2003) The genetics of TBP and TBP-related factors. *Trends Biochem Sci*, **28**, 391-398.
- de Jager, M., Dronkert, M.L., Modesti, M., Beerens, C.E., Kanaar, R. and van Gent, D.C. (2001a) DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1317-1325.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R. and Wyman, C. (2001b) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell*, **8**, 1129-1135.
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S. and Martinez-Balbas, M.A. (2005) Do protein motifs read the histone code? *Bioessays*, **27**, 164-175.
- de la Serna, I.L., Carlson, K.A. and Imbalzano, A.N. (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet*, **27**, 187-190.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D. and Chu, G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J*, **21**, 3192-3200.

- Di Leonardo, A., Khan, S.H., Linke, S.P., Greco, V., Seidita, G. and Wahl, G.M. (1997) DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res*, **57**, 1013-1019.
- Dikstein, R., Ruppert, S. and Tjian, R. (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell*, **84**, 781-790.
- Dilworth, F.J. and Chambon, P. (2001) Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*, **20**, 3047-3054.
- Dimitri, P., Corradini, N., Rossi, F. and Verni, F. (2005) The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays*, **27**, 29-41.
- 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.
- Donze, D. and Kamakaka, R.T. (2001) RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **20**, 520-531.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R. and Richmond, T.J. (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, **306**, 1571-1573.
- Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H.R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M.M., Verdin, E. and Ott, M. (2002) Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J*, **21**, 2715-2723.
- Dotson, M.R., Yuan, C.X., Roeder, R.G., Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Jiang, Y.W., Li, Y., Kornberg, R.D. and Asturias, F.J. (2000) Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14307-14310.
- Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P. and Cote, J. (2004) Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell*, **16**, 979-990.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S. and Cote, J. (2004) Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans. *Mol Cell Biol*, **24**, 1884-1896.
- Dubrovskaya, V., Lavigne, A.-C., Davidson, I., Acker, J., Staub, A. and Tora, L. (1996) Distinct domains of hTAF_{II}100 are required for functional interaction with transcription factor TFIIF β (RAP30) and incorporation into the TFIID complex. *EMBO J*, **15**, 3702-3712.
- Dudasova, Z., Dudas, A. and Chovanec, M. (2004) Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 581-601.
- Dudley, A.M., Rougeulle, C. and Winston, F. (1999) The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo. *Genes Dev*, **13**, 2940-2945.
- Durocher, D. and Jackson, S.P. (2001) DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 225-231.
- Dutnall, R.N., Tafrov, S.T., Sternglanz, R. and Ramakrishnan, V. (1998) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell*, **94**, 427-438.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R. (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, **66**, 563-576.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, **12**, 2245-2262.

- Eberharter, A., Sterner, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1999) The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]. *Mol Cell Biol*, **19**, 6621-6631.
- Eisen, A., Utley, R.T., Nourani, A., Allard, S., Schmidt, P., Lane, W.S., Lucchesi, J.C. and Cote, J. (2001) The yeast NuA4 and *Drosophila* MSL complexes contain homologous subunits important for transcription regulation. *J Biol Chem*, **276**, 3484-3491.
- Eissenberg, J.C. (2001) Decisive factors: a transcription activator can overcome heterochromatin silencing. *Bioessays*, **23**, 767-771.
- Eissenberg, J.C. and Hilliker, A.J. (2000) Versatility of conviction: heterochromatin as both a repressor and an activator of transcription. *Genetica*, **109**, 19-24.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G. and Allshire, R.C. (1997) Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell*, **91**, 1021-1032.
- Espinosa, J.M. and Emerson, B.M. (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*, **8**, 57-69.
- Espinosa, J.M., Verdun, R.E. and Emerson, B.M. (2003) p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell*, **12**, 1015-1027.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.
- Fairley, J.A., Evans, R., Hawkes, N.A. and Roberts, S.G. (2002) Core promoter-dependent TFIIB conformation and a role for TFIIB conformation in transcription start site selection. *Mol Cell Biol*, **22**, 6697-6705.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J. and Bartek, J. (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*, **30**, 290-294.
- Featherstone, M. (2002) Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 149-155.
- Felsenfeld, G., Clark, D. and Studitsky, V. (2000) Transcription through nucleosomes. *Biophys Chem*, **86**, 231-237.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. and Amati, B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*, **17**, 1115-1129.
- Florin-Christensen, M., Missero, C., Dotto, G.P. and Florin-Christensen, J. (1992) The E1a gene prevents inhibition of keratinocyte proliferation by dexamethasone. *Exp Cell Res*, **203**, 285-288.
- Fondell, J.D., Brunel, F., Hisatake, K. and Roeder, R.G. (1996a) Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **16**, 281-287.
- Fondell, J.D., Ge, H. and Roeder, R.G. (1996b) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 8329-8333.
- Francastel, C., Magis, W. and Groudine, M. (2001) Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12120-12125.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. and Amati, B. (2003) MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep*, **4**, 575-580.

- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S. and Amati, B. (2001) Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev*, **15**, 2069-2082.
- Fraser, P. and Grosveld, F. (1998) Locus control regions, chromatin activation and transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 361-365.
- Freiman, R.N., Albright, S.R., Chu, L.E., Zheng, S., Liang, H.E., Sha, W.C. and Tjian, R. (2002) Redundant role of tissue-selective TAF(II)105 in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **22**, 6564-6572.
- Fritsch, O., Benvenuto, G., Bowler, C., Molinier, J. and Hohn, B. (2004) The INO80 protein controls homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*, **16**, 479-485.
- Fry, C.J., Pearson, A., Malinowski, E., Bartley, S.M., Greenblatt, J. and Farnham, P.J. (1999) Activation of the murine dihydrofolate reductase promoter by E2F1. A requirement for CBP recruitment. *J Biol Chem*, **274**, 15883-15891.
- Fry, C.J. and Peterson, C.L. (2001) Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol*, **11**, R185-197.
- Fryer, C.J. and Archer, T.K. (1998) Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, **393**, 88-91.
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y. and Livingston, D.M. (2001) The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*, **106**, 297-307.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner, W.M. and Pommier, Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*, **278**, 20303-20312.
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J. and Cote, J. (2000) Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol Cell*, **5**, 927-937.
- Gangloff, Y.G., Sanders, S.L., Romier, C., Kirschner, D., Weil, P.A., Tora, L. and Davidson, I. (2001) Histone folds mediate selective heterodimerization of yeast TAF(II)25 with TFIID components yTAF(II)47 and yTAF(II)65 and with SAGA component ySPT7. *Mol Cell Biol*, **21**, 1841-1853.
- Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., LePenec, J.P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B. and Chambon, P. (1979) Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature*, **278**, 428-434.
- Gaughan, L., Brady, M.E., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2001) Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J Biol Chem*, **276**, 46841-46848.
- Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem*, **277**, 25904-25913.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *Embo J*, **11**, 4145-4152.
- Gershenson, N.I. and Ioshikhes, I.P. (2005) Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics*, **21**, 1295-1300.
- Giles, R.H., Peters, D.J. and Breuning, M.H. (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet*, **14**, 178-183.

- 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**, |2-|6.
- 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.
- Gontijo, A.M., Green, C.M. and Almouzni, G. (2003) Repairing DNA damage in chromatin. *Biochimie*, **85**, 1133-1147.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, **14**, 1553-1577.
- Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131-142.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, **11**, 1640-1650.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R. and Workman, J.L. (1998a) A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, **94**, 45-53.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Yates, J.R. and Workman, J.L. (1998b) The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell*, **2**, 863-867.
- Green, C.M. and Almouzni, G. (2003) Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo. *Embo J*, **22**, 5163-5174.
- Gronostajski, R.M. (2000) Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, **249**, 31-45.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Gu, W., Shi, X.L. and Roeder, R.G. (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, **387**, 8|23.
- Gu, X.Y., Weinfeld, M.A. and Povirk, L.F. (1998) Implication of DNA-dependent protein kinase in an early, essential, local phosphorylation event during end-joining of DNA double-strand breaks in vitro. *Biochemistry*, **37**, 9827-9835.
- Guermah, M., Tao, Y. and Roeder, R.G. (2001) Positive and negative TAF(II) functions that suggest a dynamic TFIID structure and elicit synergy with traps in activator-induced transcription. *Mol Cell Biol*, **21**, 6882-6894.
- Gurley, L.R., D'Anna, J.A., Barham, S.S., Deaven, L.L. and Tobey, R.A. (1978) Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*, **84**, 1-15.
- Halkidou, K., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2004) Putative involvement of the histone acetyltransferase Tip60 in ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1654-1665.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y. and Kedes, L. (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, **96**, 405-413.
- Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 132-139.

- Hansen, S.K., Takada, S., Jacobson, R.H., Lis, J.T. and Tjian, R. (1997) Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell*, **91**, 71-83.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R. and Brown, M. (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11540-11545.
- 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*, **9**, 9.
- Harfst, E., Cooper, S., Neubauer, S., Distel, L. and Grawunder, U. (2000) Normal V(D)J recombination in cells from patients with Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol*, **37**, 915-929.
- Hartzog, G.A., Speer, J.L. and Lindstrom, D.L. (2002) Transcript elongation on a nucleoprotein template. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 276-286.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, **111**, 369-379.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J. and Dawid, I.B. (1992) The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2603.
- 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.
- Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. and Allis, C.D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348-360.
- Henikoff, S., Ahmad, K. and Malik, H.S. (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, **293**, 1098-1102.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S. and van Steensel, B. (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 716-721.
- Henikoff, S., Furuyama, T. and Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, **20**, 320-326.
- Herceg, Z., Hulla, W., Gell, D., Cuenin, C., Leonart, M., Jackson, S. and Wang, Z.Q. (2001) Disruption of Trrap causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Nat Genet*, **29**, 206-211.
- Herceg, Z., Li, H., Cuenin, C., Shukla, V., Radolf, M., Steinlein, P. and Wang, Z.Q. (2003) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor Trrap in conditional knockout cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 7011-7023.
- Herceg, Z. and Wang, Z.Q. (2005) Rendez-vous at Mitosis: TRRAPed in the Chromatin. *Cell Cycle*, **4**.
- Herrera, J.E., Sakaguchi, K., Bergel, M., Trieschmann, L., Nakatani, Y. and Bustin, M. (1999) Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol*, **19**, 3466-3473.
- Hill, D.A. and Imbalzano, A.N. (2000) Human SWI/SNF nucleosome remodeling activity is partially inhibited by linker histone H1. *Biochemistry*, **39**, 11649-11656.
- Hoffmann, A., Chiang, C.M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S.K., Nakatani, Y. and Roeder, R.G. (1996) A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*, **380**, 356-359.

- Hoffmann, A., Oelgeschlager, T. and Roeder, R.G. (1997) Considerations of transcriptional control mechanisms: do TFIID-core promoter complexes recapitulate nucleosome-like functions? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94**, 8928-8935.
- 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.
- Horn, P.J., Carruthers, L.M., Logie, C., Hill, D.A., Solomon, M.J., Wade, P.A., Imbalzano, A.N., Hansen, J.C. and Peterson, C.L. (2002) Phosphorylation of linker histones regulates ATP-dependent chromatin remodeling enzymes. *Nat Struct Biol*, **9**, 263-267.
- Hou, S.Y., Wu, S.Y., Zhou, T., Thomas, M.C. and Chiang, C.M. (2000) Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol Cell Biol*, **20**, 113-125.
- Howe, L., Auston, D., Grant, P., John, S., Cook, R.G., Workman, J.L. and Pillus, L. (2001) Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev*, **15**, 3144-3154.
- Huang, J. and Dynan, W.S. (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res*, **30**, 667-674.
- Huisinga, K.L. and Pugh, B.F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **13**, 573-585.
- Ikeda, K., Steger, D.J., Eberharter, A. and Workman, J.L. (1999) Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol*, **19**, 855-863.
- Ikeda, K., Stuehler, T. and Meisterernst, M. (2002) The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells*, **7**, 49-58.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. and Nakatani, Y. (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, **102**, 463-473.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. and Wang, H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, **22**, 5834-5847.
- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P. and Ge, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr.Biol*, **7**, 689-692.
- Ing, N.H., Beekman, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J.Biol.Chem.*, **267**, 17617-17623.
- Ingles, C.J., Shales, M., Cress, W.D., Triezenberg, S.J. and Greenblatt, J. (1991) Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature*, **351**, 588-590.
- Ingvarsdottir, K., Krogan, N.J., Emre, N.C., Wyce, A., Thompson, N.J., Emili, A., Hughes, T.R., Greenblatt, J.F. and Berger, S.L. (2005) H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell Biol*, **25**, 1162-1172.
- Iratni, R., Yan, Y.T., Chen, C., Ding, J., Zhang, Y., Price, S.M., Reinberg, D. and Shen, M.M. (2002) Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1. *Science*, **298**, 1996-1999.

- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. and Yao, T.P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J*, **20**, 1331-1340.
- Ito, M., Yuan, C.X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J.D., Yamamura, S., Fu, Z.Y., Zhang, X., Qin, J. and Roeder, R.G. (1999a) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*, **3**, 361-370.
- Ito, M., Yuan, C.X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J.D., Yamamura, S., Fu, Z.Y., Zhang, X., Qin, J. and Roeder, R.G. (1999b) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*, **3**, 361-370.
- Ito, M., Yuan, C.X., Okano, H.J., Darnell, R.B. and Roeder, R.G. (2000a) Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell*, **5**, 683-693.
- Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W.L. and Muramatsu, M. (2000b) p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev*, **14**, 1899-1907.
- Jackson, S.P., Mac Donald, J.J., Lees-Miller, S. and Tjian, R. (1990) GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, **63**, 155-165.
- Jackson, V. (1990) In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry*, **29**, 719-731.
- Jacobson, R.H. and Tjian, R. (1996) Transcription factor IIA: a structure with multiple functions. *Science*, **272**, 827-828.
- 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.
- Jason, L.J., Moore, S.C., Lewis, J.D., Lindsey, G. and Ausio, J. (2002) Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays*, **24**, 166-174.
- Jazayeri, A., McAINSH, A.D. and Jackson, S.P. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1644-1649.
- Johnson, K.M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C. and Carey, M. (2002) TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. *Genes Dev*, **16**, 1852-1863.
- Johnson, S.A., Dubeau, L., Kawalek, M., Dervan, A., Schonthal, A.H., Dang, C.V. and Johnson, D.L. (2003) Increased expression of TATA-binding protein, the central transcription factor, can contribute to oncogenesis. *Mol Cell Biol*, **23**, 3043-3051.
- Jongmans, W., Vuillaume, M., Chrzanowska, K., Smeets, D., Sperling, K. and Hall, J. (1997) Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol*, **17**, 5016-5022.
- Kaiser, K. and Meisterernst, M. (1996) The human general co-factors. *Trends Biochem Sci*, **21**, 342-345.
- Kamakaka, R.T. and Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev*, **19**, 295-310.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D. and Chinnadurai, G. (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, **216**, 357-366.
- Kettenberger, H., Armache, K.J. and Cramer, P. (2003) Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell*, **114**, 347-357.

- Kettenberger, H., Armache, K.J. and Cramer, P. (2004) Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, **16**, 955-965.
- Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.
- Kim, J. and Iyer, V.R. (2004) Global role of TATA box-binding protein recruitment to promoters in mediating gene expression profiles. *Mol Cell Biol*, **24**, 8104-8112.
- Kim, J.L. and Burley, S.K. (1994) 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. *Nat Struct Biol*, **1**, 638-653.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E. and Kastan, M.B. (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem*, **274**, 37538-37543.
- Kimura, A. and Horikoshi, M. (1998) Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells*, **3**, 789-800.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K. and Komatsu, K. (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol*, **12**, 1846-1851.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, **279**, 703-707.
- Koundrioukoff, S., Polo, S. and Almouzni, G. (2004) Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 969-978.
- Kraus, W.L. and Kadonaga, J.T. (1998) p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev*, **12**, 331-342.
- Kraus, W.L., Manning, E.T. and Kadonaga, J.T. (1999) Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Mol Cell Biol*, **19**, 8123-8135.
- Krebs, J.E., Fry, C.J., Samuels, M.L. and Peterson, C.L. (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell*, **102**, 587-598.
- Krebs, J.E., Kuo, M.H., Allis, C.D. and Peterson, C.L. (1999) Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev*, **13**, 1412-1421.
- Kundu, T.K., Palhan, V.B., Wang, Z., An, W., Cole, P.A. and Roeder, R.G. (2000) Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Mol Cell*, **6**, 551-561.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20**, 615-626.
- 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.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E. and Allis, C.D. (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev*, **12**, 627-639.
- Kuras, L., Kosa, P., Mencia, M. and Struhl, K. (2000) TAF-Containing and TAF-independent forms of transcriptionally active TBP in vivo. *Science*, **288**, 1244-1248.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2004) Acetylation by Tip60 is

- required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, **306**, 2084-2087.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebricht, 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.
- Lang, S.E. and Hearing, P. (2003) The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene*, **22**, 2836-2841.
- Lang, S.E., McMahon, S.B., Cole, M.D. and Hearing, P. (2001) E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J Biol Chem*, **276**, 32627-32634.
- Langelier, M.F., Forget, D., Rojas, A., Porlier, Y., Burton, Z.F. and Coulombe, B. (2001) Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIE and TFIIIF in transcription initiation by RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **276**, 38652-38657.
- Larschan, E. and Winston, F. (2001) The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev*, **15**, 1946-1956.
- Larschan, E. and Winston, F. (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Mol Cell Biol*, **25**, 114-123.
- Lee, D.K., Kim, S. and Lis, J.T. (1999) Different upstream transcriptional activators have distinct coactivator requirements. *Genes Dev*, **13**, 2934-2939.
- Lee, J.H., Ghirlando, R., Bhaskara, V., Hoffmeyer, M.R., Gu, J. and Paull, T.T. (2003a) Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. *J Biol Chem*, **278**, 45171-45181.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, **304**, 93-96.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science*.
- Lee, K.C., Li, J., Cole, P.A., Wong, J. and Kraus, W.L. (2003b) Transcriptional activation by thyroid hormone receptor-beta involves chromatin remodeling, histone acetylation, and synergistic stimulation by p300 and steroid receptor coactivators. *Mol Endocrinol*, **17**, 908-922.
- Lee, L.T., Tan-Un, K.C., Lin, M.C. and Chow, B.K. (2005) Retinoic acid activates human secretin gene expression by Sp proteins and nuclear factor I in neuronal SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, **93**, 339-350.
- Lee, T.I., Causton, H.C., Holstege, F.C., Shen, W.C., Hannett, N., Jennings, E.G., Winston, F., Green, M.R. and Young, R.A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, **405**, 701-704.
- Lees-Miller, S.P., Chen, Y.R. and Anderson, C.W. (1990) Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol Cell Biol*, **10**, 6472-6481.
- Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M. and Trouche, D. (2004) Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem*, **279**, 44825-44833.
- Lemercier, C., Legube, G., Caron, C., Louwagie, M., Garin, J., Trouche, D. and Khochbin, S. (2003) Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem*, **278**, 4713-4718.
- LeRoy, G., Orphanides, G., Lane, W.S. and Reinberg, D. (1998) Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro [see comments]. *Science*, **282**, 1900-1904.

BIBLIOGRAPHIE

- Lescure, A., Lutz, Y., Eberhard, D., Jacq, X., Krol, A., Grummt, I., Davidson, I., Chambon, P. and Tora, L. (1994) The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters. *Embo J*, **13**, 1166-1175.
- Leurent, C., Sanders, S., Demény, M., Garbett, K.A., Ruhlmann, C., Weil, A.P., Tora, L. and Schultz, P. (2004) Mapping key functional sites within yeast TFIID. *Embo J*, **in press**.
- Leurent, C., Sanders, S., Ruhlmann, C., Mallouh, V., Weil, P.A., Kirschner, D.B., Tora, L. and Schultz, P. (2002) Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *Embo J*, **21**, 3424-3433.
- Lewis, B.A. and Reinberg, D. (2003) The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci*, **116**, 3667-3675.
- Li, H., Cuenin, C., Murr, R., Wang, Z.Q. and Herceg, Z. (2004) HAT cofactor Trrap regulates the mitotic checkpoint by modulation of Mad1 and Mad2 expression. *Embo J*, **23**, 4824-4834.
- Li, J. and Stern, D.F. (2005) Regulation of CHK2 by DNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem*, **280**, 12041-12050.
- Li, X.Y., Bhaumik, S.R. and Green, M.R. (2000) Distinct classes of yeast promoters revealed by differential TAF recruitment. *Science*, **288**, 1242-1244.
- Li, X.Y., Bhaumik, S.R., Zhu, X., Li, L., Shen, W.C., Dixit, B.L. and Green, M.R. (2002) Selective recruitment of TAFs by yeast upstream activating sequences. Implications for eukaryotic promoter structure. *Curr Biol*, **12**, 1240-1244.
- Liao, S.M., Zhang, J., Jeffery, D.A., Koleske, A.J., Thompson, C.M., Chao, D.M., Viljoen, M., van Vuuren, H.J. and Young, R.A. (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme [see comments]. *Nature*, **374**, |3-|6.
- Lieberman, P.M. and Berk, A.J. (1994) A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA--promoter DNA complex formation. *Genes.Dev.*, **8**, 995-1006.
- Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H. and Kastan, M.B. (2000) ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, **404**, 613-617.
- Liu, D., Ishima, R., Tong, K.I., Bagby, S., Kokubo, T., Muhandiram, D.R., Kay, L.E., Nakatani, Y. and Ikura, M. (1998) Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell*, **94**, 573-583.
- Liu, G., Xia, T. and Chen, X. (2003a) The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem*, **278**, 17557-17565.
- 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, X., Tesfai, J., Evrard, Y.A., Dent, S.Y. and Martinez, E. (2003b) c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem*, **278**, 20405-20412.
- Lo, W.S., Gamache, E.R., Henry, K.W., Yang, D., Pillus, L. and Berger, S.L. (2005) Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *Embo J*.
- 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.

- Lomvardas, S. and Thanos, D. (2002) Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell*, **110**, 261-271.
- Lorch, Y., Cairns, B.R., Zhang, M. and Kornberg, R.D. (1998) Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell*, **94**, 29-34.
- Loyola, A. and Almouzni, G. (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 3-11.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Mahadevan, L.C., Willis, A.C. and Barratt, M.J. (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-783.
- Maile, T., Kwoczynski, S., Katzenberger, R.J., Wassarman, D.A. and Sauer, F. (2004) TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science*, **304**, 1010-1014.
- Malik, S. and Roeder, R.G. (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*, **25**, 277-283.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A. and Yaffe, M.B. (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, **302**, 636-639.
- Manolis, K.G., Nimmo, E.R., Hartsuiker, E., Carr, A.M., Jeggo, P.A. and Allshire, R.C. (2001) Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*, **20**, 210-221.
- 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.
- Martens, J.A. and Winston, F. (2002) Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, **16**, 2231-2236.
- Martianov, I., Fimia, G.M., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. and Davidson, I. (2001) Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/TRF2 gene. *Mol Cell*, **7**, 509-515.
- Martin, J., Halenbeck, R. and Kaufmann, J. (1999) Human transcription factor hTAF(II)150 (CIF150) is involved in transcriptional regulation of cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **19**, 5548-5556.
- Martinez, E., Chiang, C.M., Ge, H. and Roeder, R.G. (1994) TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J*, **13**, 3115-3126.
- Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lyman, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T. and Roeder, R.G. (2001) Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol*, **21**, 6782-6795.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J*, **19**, 662-671.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K. and Giacca, M. (2000) E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem*, **275**, 10887-10892.
- 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.
- May, M., Mengus, G., Lavigne, A.C., Chambon, P. and Davidson, I. (1996a) Human TAF(II)28 promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *EMBO J*, **15**, 3093-3104.

- May, M., Mengus, G., Lavigne, A.-C., Chambon, P. and Davidson, I. (1996b) Human TAFII28 promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *EMBO*, **15**, 3093-3104.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. and Cole, M.D. (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c- Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, **94**, 363-374.
- McMahon, S.B., Wood, M.A. and Cole, M.D. (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*, **20**, 556-562.
- Megee, P.C., Morgan, B.A. and Smith, M.M. (1995) Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev*, **9**, 1716-1727.
- Memedula, S. and Belmont, A.S. (2003) Sequential recruitment of HAT and SWI/SNF components to condensed chromatin by VP16. *Curr Biol*, **13**, 241-246.
- Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P. and Davidson, I. (1997) Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.*, **11**, 1381-1395.
- Merkenschlager, M., Amoils, S., Roldan, E., Rahemtulla, A., O'Connor, E., Fisher, A.G. and Brown, K.E. (2004) Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *J Exp Med*, **200**, 1437-1444.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, **115**, 751-763.
- Michael, D. and Oren, M. (2002) The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 53-59.
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B. and Weaver, D.T. (1996) Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 4189-4198.
- Missero, C., Calautti, E., Eckner, R., Chin, J., Tsai, L.H., Livingston, D.M. and Dotto, G.P. (1995) Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5451-5455.
- 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 TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, **87**, 1261-1270.
- Mohrmann, L. and Verrijzer, C.P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*, **1681**, 59-73.
- Moore, J.K. and Haber, J.E. (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 2164-2173.
- Moqtaderi, Z., Bai, Y., Poon, D., Weil, P.A. and Struhl, K. (1996) TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature*, **383**, 188-191.
- Moqtaderi, Z., Keaveney, M. and Struhl, K. (1998) The histone H3-like TAF is broadly required for transcription in yeast. *Mol Cell*, **2**, 675-682.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**, 131-134.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E. and Shen, X. (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*, **119**, 767-775.
- Muller, F. and Tora, L. (2003) The multicoloured world of promoter recognition complexes. *Embo J*, **in press**.

- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Hayashibara, K.C., Brown, P.O. and Kornberg, R.D. (1999) Mediator protein mutations that selectively abolish activated transcription [see comments]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 67-72.
- Mymryk, J.S. and Bayley, S.T. (1994) Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res*, **33**, 89-97.
- Naar, A.M., Taatjes, D.J., Zhai, W., Nogales, E. and Tjian, R. (2002) Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev*, **16**, 1339-1344.
- Nacheva, G.A., Guschin, D.Y., Preobrazhenskaya, O.V., Karpov, V.L., Ebralidse, K.K. and Mirzabekov, A.D. (1989) Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell*, **58**, 27-36.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.
- Nikiforov, M.A., Chandriani, S., Park, J., Kotenko, I., Matheos, D., Johnsson, A., McMahon, S.B. and Cole, M.D. (2002) TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol*, **22**, 5054-5063.
- 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.
- Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Usheva, A.A., Hisatake, K., Lee, D.K., Roeder, R.G. and Burley, S.K. (1995) Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature*, **377**, 119-128.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, **20**, 214-220.
- Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y.K. and Roeder, R.G. (1998) Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAFIIs. *Mol Cell*, **1**, 925-931.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, 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.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, **10**, 2657-2683.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, **108**, 439-451.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999) The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284-288.
- Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C.E., Yates, J.R., 3rd, Sternglanz, R. and Workman, J.L. (2001) The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes Dev*, **15**, 3155-3168.
- 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.
- Ozer, J., Lezina, L.E., Ewing, J., Audi, S. and Lieberman, P.M. (1998) Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional

- activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 2559-2570.
- Palancade, B. and Bensaude, O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem*, **270**, 3859-3870.
- Paques, F. and Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 349-404.
- Park, E.J., Chan, D.W., Park, J.H., Oettinger, M.A. and Kwon, J. (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6819-6827.
- Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S.B. and Cole, M.D. (2001) The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev*, **15**, 1619-1624.
- Park, J., Wood, M.A. and Cole, M.D. (2002) BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation. *Mol Cell Biol*, **22**, 1307-1316.
- Parvin, J.D. and Young, R.A. (1998) Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 565-570.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A. and McMahon, S.B. (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol*, **24**, 10826-10834.
- Paull, T.T. and Gellert, M. (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, **1**, 969-979.
- Paull, T.T. and Gellert, M. (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*, **13**, 1276-1288.
- Peterson, C.L. and Cote, J. (2004) Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*, **18**, 602-616.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol*, **14**, R546-551.
- Peterson, C.L. and Workman, J.L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 187-192.
- Peterson, M.G., Tanese, N., Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990) Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein [published erratum appears in *Science* 1990 Aug 24; 249(4971):844]. *Science*, **248**, 1625-1630.
- 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.
- Pointud, J.C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. and Davidson, I. (2003) The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci*, **116**, 1847-1858.
- Polesskaya, A., Naguibneva, I., Fritsch, L., Duquet, A., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Vervisch, A., Pritchard, L.L., Cole, P. and Harel-Bellan, A. (2001) CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *Embo J*, **20**, 6816-6825.
- Poon, D., Bai, Y., Campbell, A.M., Bjorklund, S., Kim, Y.J., Zhou, S., Kornberg, R.D. and Weil, P.A. (1995) Identification and characterization of a TFIID-like multiprotein complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 8224-8228.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, **433**, 434-438.

- Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., McMahon, S.J., Wood, J.M., Kennedy, E.L., Cook, R.G., Workman, J.L., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2002) The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol Cell Biol*, **22**, 8774-8786.
- Pugh, B.F. (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, **255**, 1-14.
- Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*, **61**, 1187-1197.
- Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.J., Hamamori, Y., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. and Levrero, M. (1997) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell*, **1**, 35-45.
- Qiu, H., Hu, C., Zhang, F., Hwang, G.J., Swanson, M.J., Boonchird, C. and Hinnebusch, A.G. (2005) Interdependent recruitment of SAGA and Srb mediator by transcriptional activator Gcn4p. *Mol Cell Biol*, **25**, 3461-3474.
- Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S. and Almouzni, G. (2005) [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 384-389.
- Razin, A. and Riggs, A.D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science*, **210**, 604-610.
- Reddy, Y.V., Ding, Q., Lees-Miller, S.P., Meek, K. and Ramsden, D.A. (2004) Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J Biol Chem*, **279**, 39408-39413.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 162-169.
- Reese, J.C. (2003) Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 114-118.
- Reese, J.C., Apone, L., Walker, S.S., Griffin, L.A. and Green, M.R. (1994) Yeast TAFIIS in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature*, **371**, 523-527.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell*, **11**, 695-707.
- Reid, J.L., Bannister, A.J., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M.A. and Kouzarides, T. (1998) E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *Embo J*, **17**, 4469-4477.
- Reid, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Struhl, K. (2000) Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol Cell*, **6**, 1297-1307.
- Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A. and Pillus, L. (1996) Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet*, **14**, 42-49.
- Reines, D., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1996) The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem Sci*, **21**, 351-355.
- 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 TFIIF. *Mol Cell*, **2**, 341-351.
- Robert, F., Pokholok, D.K., Hannett, N.M., Rinaldi, N.J., Chandy, M., Rolfe, A., Workman, J.L., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2004) Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol Cell*, **16**, 199-209.
- Robinson-Rechavi, M., Escrivá Garcia, H. and Laudet, V. (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*, **116**, 585-586.

BIBLIOGRAPHIE

- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rossignol, M., Keriél, A., Staub, A. and Egly, J.M. (1999) Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor. *J Biol Chem*, **274**, 22387-22392.
- Ruiz-Garcia, A.B., Sendra, R., Pamblanco, M. and Tordera, V. (1997) Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Lett*, **403**, 186-190.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. and Ptashne, M. (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564.
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R. and Brandl, C.J. (1997) Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J Biol Chem*, **272**, 5571-5578.
- Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S.B., Litchfield, D.W., Yates, J.R., Lees-Miller, S.P., Cole, M.D. and Brandl, C.J. (1998) Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J.Biol Chem.*, **273**, 26559-26565.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, **103**, 411-422.
- Sarma, K. and Reinberg, D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 139-149.
- Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y. and Kedes, L. (1999) Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol Cell*, **4**, 725-734.
- Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S.K., Banks, C.A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M.P., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (2004) A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell*, **14**, 685-691.
- Savkur, R.S. and Burris, T.P. (2004) The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res*, **63**, 207-212.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. and Nakatani, Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J.Biol Chem.*, **274**, 1189-1192.
- Schiltz, R.L. and Nakatani, Y. (2000) The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*, **1470**, M37-53.
- Schwartz, B.E. and Ahmad, K. (2005) Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev*, **19**, 804-814.
- Segil, N., Guermah, M., Hoffmann, A., Roeder, R.G. and Heintz, N. (1996) Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes Dev*, **10**, 2389-2400.
- Sekiguchi, J., Ferguson, D.O., Chen, H.T., Yang, E.M., Earle, J., Frank, K., Whitlow, S., Gu, Y., Xu, Y., Nussenzweig, A. and Alt, F.W. (2001) Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3243-3248.
- Sekiguchi, T., Nohiro, Y., Nakamura, Y., Hisamoto, N. and Nishimoto, T. (1991) The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding protein. *Mol.Cell Biol.*, **11**, 3317-3325.
- Selleck, W., Howley, R., Fang, Q., Podolny, V., Fried, M.G., Buratowski, S. and Tan, S. (2001) A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional coactivator. *Nat Struct Biol*, **8**, 695-700.

- Sewack, G.F., Ellis, T.W. and Hansen, U. (2001) Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol Cell Biol*, **21**, 1404-1415.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A. and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, **103**, 843-852.
- Shao, H., Revach, M., Moshonov, S., Tzuman, Y., Gazit, K., Albeck, S., Unger, T. and Dikstein, R. (2005) Core promoter binding by histone-like TAF complexes. *Mol Cell Biol*, **25**, 206-219.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.
- Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D. (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, **18**, 2437-2468.
- Smith, G.C., Cary, R.B., Lakin, N.D., Hann, B.C., Teo, S.H., Chen, D.J. and Jackson, S.P. (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11134-11139.
- Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N. and Talianidis, I. (2000) Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J Biol Chem*, **275**, 12515-12520.
- Soutoglou, E. and Talianidis, I. (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, **295**, 1901-1904.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.
- Stafford, G.A. and Morse, R.H. (2001) GCN5 dependence of chromatin remodeling and transcriptional activation by the GAL4 and VP16 activation domains in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 4568-4578.
- Steinmetz, A.C., Renaud, J.P. and Moras, D. (2001) Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**, 329-359.
- Sterner, D.E., Belotserkovskaya, R. and Berger, S.L. (2002a) SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11622-11627.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., Winston, F., Workman, J.L. and Berger, S.L. (1999) Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol*, **19**, 86-98.
- Sterner, D.E., Wang, X., Bloom, M.H. and Berger, S.L. (2002b) The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *J Biol Chem*, **277**, 2121-2126.
- Stevens, J.L., Cantin, G.T., Wang, G., Shevchenko, A. and Berk, A.J. (2002) Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science*, **296**, 755-758.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H. and Taylor, A.M. (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, **99**, 577-587.

- Stringer, K.F., Ingles, C.J. and Greenblatt, J. (1990) Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature*, **345**, 783-786.
- Strobeck, M.W., Knudsen, K.E., Fribourg, A.F., DeCristofaro, M.F., Weissman, B.E., Imbalzano, A.N. and Knudsen, E.S. (2000) BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7748-7753.
- Struhl, K. (1996) Transcriptional enhancement by acidic activators. *Biochim.Biophys.Acta*, **1288**, O15-O17.
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.*, **12**, 599-606.
- 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.
- Sugawara, N., Wang, X. and Haber, J.E. (2003) In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell*, **12**, 209-219.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J. and Grunstein, M. (2001) Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell*, **8**, 473-479.
- Svejstrup, J.Q. (2004) The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 64-73.
- Taatjes, D.J., Naar, A.M., Andel, F., 3rd, Nogales, E. and Tjian, R. (2002) Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science*, **295**, 1058-1062.
- Tan, S., Hunziker, Y., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1996) Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature*, **381**, 127-151.
- Tang, Y., Liu, D.P. and Liang, C.C. (2002) Further understanding of the beta-globin locus regulation at the molecular level: looping or linking models? *Genes Cells*, **7**, 889-900.
- Tao, Y., Guermah, M., Martinez, E., Oegelschlager, T., Hasegawa, S., Takada, R., Yamamoto, T., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1997) Specific interactions and potential functions of human TAFII100. *J.Biol Chem.*, **272**, 6714-6721.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. and Amati, B. (2004) E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol*, **24**, 4546-4556.
- Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., van Gent, D.C., Shiraishi, T., Verkaik, N.S., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S. and Komatsu, K. (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, **420**, 93-98.
- Timmers, H.T. and Tora, L. (2005) SAGA unveiled. *Trends Biochem Sci*, **30**, 7-10.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T. and Saito, H. (2000) c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene*, **19**, 444-451.
- Topalidou, I., Papamichos-Chronakis, M., Thireos, G. and Tzamarias, D. (2004) Spt3 and Mot1 cooperate in nucleosome remodeling independently of TBP recruitment. *Embo J*, **23**, 1943-1948.
- Tora, L. (2002) A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*, **16**, 673-675.
- Trouche, D., Cook, A. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4139-4145.
- Tsai, F.T. and Sigler, P.B. (2000) Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *Embo J*, **19**, 25-36.

- Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C.C., Shiloach, J. and Wu, C. (1999) Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **13**, 686-697.
- Um, M., Yamauchi, J., Kato, S. and Manley, J.L. (2001) Heterozygous disruption of the TATA-binding protein gene in DT40 cells causes reduced *cdc25B* phosphatase expression and delayed mitosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 2435-2448.
- Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J. and Kato, S. (2005) TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 933-938.
- 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.
- Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J. and Blobel, G.A. (2005) Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell*, **17**, 453-462.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*, **21**, 6484-6494.
- Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., Prives, C., Avantiaggiati, M.L., Qin, J. and Nakatani, Y. (1998) The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol Cell*, **2**, 869-875.
- Verschure, P.J., van Der Kraan, I., Manders, E.M. and van Driel, R. (1999) Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol*, **147**, 13-24.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M. and Luscher, B. (2003) Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep*, **4**, 484-490.
- Vieyra, D., Loewith, R., Scott, M., Bonnefin, P., Boisvert, F.M., Cheema, P., Pastryeva, S., Meijer, M., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P., McMahon, S., Cole, M.D., Young, D. and Riabowol, K. (2002) Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem*, **277**, 29832-29839.
- Vignali, M., Steger, D.J., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000) Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *Embo J*, **19**, 2629-2640.
- vom Baur, E., Harbers, M., Um, S.J., Benecke, A., Chambon, P. and Losson, R. (1998) The yeast Ada complex mediates the ligand-dependent activation function AF-2 of retinoid X and estrogen receptors. *Genes Dev.*, **12**, 1278-1289.
- Walker, S.S., Reese, J.C., Apone, L.M. and Green, M.R. (1996) Transcription activation in cells lacking TAFIIs *Nature*, **383**, 185-188.
- 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. (2001a) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.
- Wang, H., Wang, M., Bocker, W. and Iliakis, G. (2005) Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J Cell Physiol*, **202**, 492-502.

- Wang, L., Liu, L. and Berger, S.L. (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev*, **12**, 640-653.
- Wang, P.J. and Page, D.C. (2002) Functional substitution for TAF(II)250 by a retroposed homolog that is expressed in human spermatogenesis. *Hum Mol Genet*, **11**, 2341-2346.
- Wang, T., Kobayashi, T., Takimoto, R., Denes, A.E., Snyder, E.L., el-Deiry, W.S. and Brachmann, R.K. (2001b) hADA3 is required for p53 activity. *Embo J*, **20**, 6404-6413.
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, **14**, 927-939.
- Ward, I.M. and Chen, J. (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, **276**, 47759-47762.
- Warfield, L., Ranish, J.A. and Hahn, S. (2004) Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. *Genes Dev*, **18**, 1022-1034.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B.R., White, M.F., Workman, J.L. and Owen-Hughes, T. (1999) Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, **400**, 784-787.
- 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.
- Winston, F. and Carlson, M. (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet*, **8**, 387-391.
- Wittschieben, B.O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C.D., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, **4**, 123-128.
- Wolffe, A.P. (2001) Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays Biochem*, **37**, 45-57.
- Wolner, B., van Komen, S., Sung, P. and Peterson, C.L. (2003) Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell*, **12**, 221-232.
- Workman, J.L., Abmayr, S.M., Cromlish, W.A. and Roeder, R.G. (1988) Transcriptional regulation by the immediate early protein of pseudorabies virus during in vitro nucleosome assembly. *Cell*, **55**, 211-219.
- Wu, C. and Lis, J.T. (1994) Transcriptional regulation of heat shock genes. In Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (eds.), *Transcription Mechanisms and Regulation*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 459-475.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F. and Schultz, P. (2004) Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell*, **15**, 199-208.
- Wu, P.Y. and Winston, F. (2002) Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 5367-5379.
- Wu, S.Y., Zhou, T. and Chiang, C.M. (2003) Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Mol Cell Biol*, **23**, 6229-6242.
- Wyce, A., Henry, K.W. and Berger, S.L. (2004) H2B ubiquitylation and de-ubiquitylation in gene activation. *Novartis Found Symp*, **259**, 63-73; discussion 73-67, 163-169.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H.Y. and Yang, Y.C. (2003) Tip60 is a co-repressor for STAT3. *J Biol Chem*, **278**, 11197-11204.

- Xie, X., Kokubo, T., Cohen, S.L., Mirza, U.A., Hoffmann, A., Chait, B.T., Roeder, R.G., Nakatani, Y. and Burley, S.K. (1996) Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*, **380**, 316-322.
- Xu, L., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 140-147.
- Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998a) Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature*, **395**, 301-306.
- Xu, W., Edmondson, D.G., Evrard, Y.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R. and Roth, S.Y. (2000) Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet*, **26**, 229-232.
- Xu, W., Edmondson, D.G. and Roth, S.Y. (1998b) Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol*, **18**, 5659-5669.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-861.
- Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, B.H. and Ozato, K. (2003) Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 1025-1033.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y.M., Yagi, T., Takata, M., Price, C., Kakazu, N. and Takeda, S. (1999) Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J*, **18**, 6619-6629.
- Yamamoto, T. and Horikoshi, M. (1997) Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem*, **272**, 30595-30598.
- Yamauchi, T., Yamauchi, J., Kuwata, T., Tamura, T., Yamashita, T., Bae, N., Westphal, H., Ozato, K. and Nakatani, Y. (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11303-11306.
- Yan, M. and Gralla, J.D. (1997) Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *Embo J*, **16**, 7457-7467.
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S.B., Cole, M.D., Tora, L., Takahashi, N. and Kato, S. (2002) Nuclear receptor function requires a TFIIIC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell*, **9**, 553-562.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.
- Yankulov, K.Y. and Bentley, D.L. (1997) Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIF. *EMBO J*, **16**, 1638-1646.
- Yao, T.P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. and Livingston, D.M. (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10626-10631.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M. and Eckner, R. (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, **93**, 361-372.

BIBLIOGRAPHIE

- Yuan, L.W. and Gambée, J.E. (2001) Histone acetylation by p300 is involved in CREB-mediated transcription on chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **1541**, 161-169.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Shioya, H., Utsugisawa, Y., Yokoyama, K., Weichselbaum, R., Shi, Y. and Kufe, D. (1999) Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. *J Biol Chem*, **274**, 1883-1886.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A. and Hahn, S. (2000) A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*, **408**, 225-229.
- 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.
- Zhang, W., Bone, J.R., Edmondson, D.G., Turner, B.M. and Roth, S.Y. (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J.*, **17**, 3155-3167.
- Zurita, M. and Merino, C. (2003) The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet*, **19**, 578-584.

RESUME

Le laboratoire au sein duquel j'ai travaillé s'intéresse à la transcription des gènes de classe II et plus particulièrement à l'étape d'assemblage de complexes multiprotéiques au niveau du promoteur.

Quelques années avant mon arrivée au laboratoire, un nouveau complexe a été isolé et caractérisé, le complexe **TFTC** (autrement dit : « *TBP Free TAF Containing Complex* »). *In vitro*, TFTC est capable **d'initier la transcription** au niveau d'un promoteur minimal, sur une matrice d'ADN nu, et est doué d'activité HAT (*Histone Acétyl Transférase*), ce qui lui confère un rôle de **coactivateur** de la transcription sur une matrice de chromatine.

In vitro, dans un contexte chromatinien, TFTC perd sa capacité à initier la transcription, et nécessite la présence du cofacteur p300 pour activer la transcription par GAL4-VP16. Grâce à des expériences de transfection, nous avons montré que certaines sous-unités de TFTC et p300 **sont conjointement requises pour activer la transcription par GAL4-VP16**.

Par la suite, en utilisant le système d'activation de la transcription par les oestrogènes, nous avons envisagé d'étudier la **dynamique d'assemblage de ces facteurs** par immunoprécipitation de la chromatine. Les résultats indiquent que certaines protéines d'un même complexe multiprotéique se fixent à différents moments au niveau d'un promoteur endogène.

J'ai alors opté pour focaliser ma thèse sur l'étude de complexes multiprotéiques contenant la protéine hTRRAP. De nouveaux partenaires de la protéine TRRAP ont été découverts, notamment le **complexe MRN** (MRE11/RAD50/NBS1). Contrairement à de nombreux complexes contenant TRRAP, aucune activité HAT associée au complexe MRN/TRRAP n'a pu être détectée. Nous avons montré que TRRAP, comme le complexe MRN, est impliquée dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par le mécanisme de NHEJ (*Non Homologous End Joining*).

Un troisième volet de la thèse concerne **la mise en évidence d'une nouvelle sous-unité du complexe TFTC, la protéine ataxin-7**.

Une anomalie génétique conduit à une protéine ataxin-7 pourvue d'une expansion de polyglutamine, l'ataxie spinocérébelleuse de type 7. Nous avons montré que l'expansion de polyglutamine provoque une désorganisation de la chromatine dans les cellules de rétine de souris, et testé l'activité HAT globale dans les rétines de souris normales ou mutées pour ataxin-7.