

THESE

présentée pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Louis Pasteur

par

Philippe KIEFFER-KWON

Titre



Soutenue publiquement le 29 Septembre 2005

Membres du jury

Rapporteur Externe :	Pr. Martin TEICHMANN
Rapporteur Externe :	Dr. Pierre JALINOT
Rapporteur Interne :	Dr. Régine LOSSON
Examineur :	Pr. Philippe CARBON
Directeur de Thèse :	Dr. Irwin DAVIDSON

THESE

présentée pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Louis Pasteur

par

Philippe KIEFFER-KWON

Titre

Etudes fonctionnelles de TBP et de son paralogue TRF2 *in vivo*.

Soutenue publiquement le 29 Septembre 2005

Membres du jury

Rapporteur Externe :	Pr. Martin TEICHMANN
Rapporteur Externe :	Dr. Pierre JALINOT
Rapporteur Interne :	Dr. Régine LOSSON
Examineur :	Pr. Philippe CARBON
Directeur de Thèse :	Dr. Irwin DAVIDSON



A Mes Grands Parents Paternels

Marie et Louis KIEFFER

A Mes Grands Parents Maternels

Alice et Fernand ANTENAT

A Ma Marraine

Elisa BLANCHE

A M^{me} **Irène DURING**

A Mon Epouse

KIEFFER-

Des personnes merveilleuses qui m'ont permis de me construire, de m'éveiller aux arts et aux sciences. Je leur dois tout. Sans elles je ne serais pas arrivé jusqu'en thèse, je leur en serai toujours reconnaissant.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr. Irwin DAVIDSON pour m'avoir accueilli dans son équipe. J'ai apprécié la qualité de son encadrement. Entre mes débuts, où Irwin m'enseignait comment réaliser une extraction ArOH/HCCl₃ ou un *gene clean* et la fin de ma thèse où je gérais de manière quasi autonome mes projets de recherche, il m'a permis de gagner en indépendance et en discernement sans jamais freiner mes initiatives (même quand il les savait mauvaises, aux pire des cas j'avais droit à « fais le si ça t'amuse ! »). J'ai été ainsi amené à maîtriser une gamme de techniques bien plus large que ce qui est présenté dans ce manuscrit, de la biologie moléculaire classique à la microscopie de pointe en passant par la biologie cellulaire. Grâce à Irwin, les cinq années passées à l'IGBMC ont été une période extrêmement riche en enseignement. Merci beaucoup Irwin.

Je remercie les membres du jury, le Professeur Philippe CARBON, le Professeur Martin TEICHMAINN, le Docteur Pierre JALINOT et le Docteur Régine LOSSON d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également tous les membres de l'équipe qui m'ont accompagné au cours de ma thèse. Anas F. dont sa générosité n'a d'égal que sa sagesse. Les petits derniers Ataaillah B & Emilie C auxquels je souhaite bonne chance pour la suite. La théophile Dominique K. qui m'a épaulé sur la fin de thèse, et pour qui je forme des vœux de réussite dans la continuation du projet TBP^{lox/-}. Igor M. qui est à l'origine de tout le travail présenté ici. Isabelle M., pour son soutien, Jean-Christophe P. toujours agréable, la pâtissière Gabrielle M, Martin K. comique avant tout. La Mamie Bella Raffaella C., pour tous les moments « culturels » qu'on a partagés ensemble. Sylvie T., compagnon fidèle de St Hélène. Virginie H., enfin, pour son dévouement.

Merci à Christophe R. qui m'a formé tout au long de mon année de DEA et enseigné les ficelles du métier.

Je tiens aussi à remercier tous les membres des services communs de l'institut : Betty H. et ses acolytes, fournisseurs de cellules et de milieu par hectolitres, également ambulanciers au petit matin... Claudine E. & Jochen B., bonne humeur garantie à tout FACS. Les serviables et extrêmement compétents microscopistes Didier H. Jean-Luc V. et Marcel B. qui ont éclairé mon travail. Mustapha O-A, toujours prêt à rendre service avec ses anticorps zélés. Jean-Marie G. dont les doigts de fée ont généré les pBabe de nouvelle génération. L'ensemble du personnel du service de séquençage et du feu service de synthèse d'oligonucléotides.

Je remercie nos collaborateurs, notamment le Dr. Marc TIMMERS et les membres de son équipe, particulièrement Pim P. avec qui travailler a été très efficace et agréable. Merci au Dr. Patrick SCHULTZ de m'avoir fourni en toute confiance et avec enthousiasme ses résultats de microscopie électronique.

Ma profonde reconnaissance à Benoît C., Laure J. et Pierre C. pour l'attention et les corrections qu'ils ont apportées à ce manuscrit. Sa qualité en a été amplement améliorée.

En ma qualité de co-président de la C.W.C. je remercie tous ses adhérents, qui à un moment ou un autre, lorsque ma vie ne tenait qu'à un fil (de 10,3mm de diamètre), ont su m'assurer des voies tranquilles. Merci à Maté D., Pierre C., Pierre H, Laurent W., Hélène D, Romain L., et Nicolas C.

Abréviations & Acronymes

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AdML : Adenovirus Major Late
ALF : TFIIA Like Factor
APL : Acute Promyelocytic Leukemia

B

Bdf1 : BromoDomain Factor 1
 β 2m : β 2-microglobine
BRE : TFIIB Responsive Element
Brf : TFIIB Related Factor

C

CAK : Cyclin-Activating Kinase complex
CB : Cajal Body
CCD : Charged Cluster Domain
CCTD : Conserved C-terminal Domain
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CFSE : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CK2 : Caséine Kinase 2
CMH-I : Complexe Majeur Histocompatibilité de classe I
CPE : Core Promoter Element
CRS : Cleavage Recognition Site
CTD : Carboxy-Terminal Domain
CWC : Climbing Word Company

D

DRIP : *vitamin-D-Receptor Interacting Protein*
DSE : Distal Sequence Element
DFC : Dense Fibrillar Components
DPE : Downstream Promoter Element
DREF : DNA replication-related element binding factor

E

EBNA2 : Epstein Barr Nuclear Antigen 2
EGF : Epidermal growth factor
ERC : Extrachromosomal rDNA Circle
ERK : Extracellulaire signal-Regulated Kinase
ETS : External Transcribed Spacer

F

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter
FC : Fibrillar Center
Fcp1 : TFIIF interacting CTD Phosphatase 1

G

GAG : Group Antigens
gfa : glial fibrillary acidic protein
GC : Granular Component
Gems : Gemini of Cajal bodies
GTF : General Transcription Factor

H

HAT : Histone Acétyl Transférase
HBX : Hepatitis virus B X protein
HNF3 : Hepatocyte Nuclear transcription Factor 3
HMG : High mobility group
HXT : High-affinity hexose-Transporter

I

ICR : Internal Control Region
IFN- β : l'interféron β
IGC : Interchromatin Granule Cluster
ISRE : IFN Stimulatory Response Element
Inr : élément initiateur des promoteur de classe II

J

JNKs : c-Jun N-terminal Kinases

K

K_D : constante de dissociation

L

LTR : Long Terminal Repeat

N

NC2 : Negative Cofactor 2
NER : Nucleotide Excision Repair
NF-Y : Nuclear Factor-Y
NOR : Nucleolar Organizer Region

M

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MED1 : Multiple start site downstream element
MMuLV : Moloney Murine Leukaemia Virus
Mot1p : Modifier Of Transcription 1 protein
MudPIT : Multidimensional Protein Identification Technology

P

PC2 : Positive Cofactor-2
PIC : PreInitiation Complex

PML-NBs : ProMyelocytic Leukaemia-Nuclear Bodies
PNB : PreNucleolar Body
Pol : ARN polymérase ADN dépendant
PSE : Proximal Sequence Element
PTEN : phosphatase and tensin homolog

R

RARE : Retinoic Acid Responsive Element
Rbp : Retinoblastoma protein
ROS : Reactive oxygen species
RPA : Replicated protein A

S

SAGA : SPT ADA GCN5 Acetyltransferase
SAPK : Stress-Activated Protein Kinase
SL1 : SeLectivity factor 1
SL-RNA : Spliced Leader RNA
SNAP_c : small nuclear RNA activating protein complex
snoRNA : small nucleolar RiboNucleic Acid
snoRNP : small nuclear RiboNucleoprotein Particle
snRNA : small nuclear RiboNucleique Acid
snRNP : small nuclear RiboNucleoprotein Particle
spm3 : altered SPecificity Mutant 3
SRE : Serum Responsive Element
STAGA : SPT3-TAF9-GCN5 Acetylase

T

TAF : TBP Associated Factor
TBP : TATA Binding Protein
TIF-IB : Transcription Initiation Factor-IB
TFTC : TBP-Free-TAF_{II}S-Complex
TRAP : Thyroid-hormone Receptor Associated Protein
TRF : TBP Related Factor

U

UAS : Upstream Activator Sequences
UBAC : ubiquitin activating and conjugating
UBF : Upstream Binding Factor
UCE : Upstream Control Element `

Y

y : yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

TABLE des MATIERES

INTRODUCTION

I L'INITIATION de la TRANSCRIPTION des GENES de CLASSE II

1.1) Les Promoteurs des Gènes de Classe II.	—page 1
1.1.1 - <u>Le Promoteur Minimal.</u>	—page 2
L'Élément TATA	
L'Élément Initiateur (Inr)	
L'Élément DPE	
Autres Éléments du Promoteur Minimal	
1.1.2 - <u>Le Promoteur Proximal.</u>	—page 5
L'Élément de Reconnaissance à TFIIB	
Autres Séquences Régulatrices Proximales	
1.1.3 - <u>Les Ilots CpG.</u>	—page 6
1.1.4 - <u>Le Promoteur Distal.</u>	—page 6
1.2) L'ARN Polymérase II ADN Dépendante.	—page 7
1.2.1 - <u>De la Structure à la Fonction.</u>	—page 9
1.2.2 - <u>L'Extrémité Carboxy-Terminale de Rpb1.</u>	—page 10
1.3) Les Rouages Initiatiques de la Transcription.	—page 12
1.3.1 - <u>TFII-D.</u>	—page 13
1.3.2 - <u>TFII-A.</u>	—page 13
1.3.3 - <u>TFII-B.</u>	—page 16
1.3.4 - <u>TFII-F.</u>	—page 16
1.3.5 - <u>TFII-E.</u>	—page 17
1.3.6 - <u>TFII-H.</u>	—page 19
1.3.7 - <u>TFII-S.</u>	—page 22
1.3.8 - <u>Le Médiateur.</u>	—page 23
1.4) L'Assemblage du complexe de Pré-Initiation	—page 27
1.5) La Réinitiation de la Transcription	—page 28

II TFIIID & les FACTEURS ASSOCIES à TBP

2.1) La Composition du TFIIID	—page 30
2.2) La Structure du TFIIID	—page 30
2.3) A TAFs Vaillants Rien d’Impossible.	—page 34
2.3.1 - <u>La Reconnaissance du Promoteur Minimal.</u>	—page 35
2.3.2 - <u>Les TAFs sont des Coactivateurs Transcriptionnels.</u>	—page 36
2.3.3 - <u>Les TAFs dans le Cycle Cellulaire.</u>	—page 36
2.3.4 - <u>Les Activités Enzymatiques du TFIIID.</u>	—page 37
2.4) B-TFIIID, l’Ambivalent.	—page 38

III TBP & ses PARALOGUES

3.1) La Structure de TBP.	—page 40
3.1.1 - <u>Le Domaine Amino-Terminal.</u>	—page 41
3.1.2 - <u>Le Domaine Carboxy-Terminal.</u>	—page 42
3.2) TBP dans la Transcription des Gènes de Classe I.	—page 43
3.3) TBP dans la Transcription des Gènes de Classe III.	—page 46
3.4) TBP dans la Prolifération Cellulaire et la Transformation Oncogénique.	—page 49
3.5) Cartographie des Sites d’Interaction de TBP.	—page 51
3.6) Le TBP spm3.	—page 55
3.7) Mutagène des Acides Aminées à la Surface de TBP par G.O. Bryant & Co.	—page 56
3.8) Les Paralogues de TBP.	—page 60

3.8.1 - <u>TBP Related Factor 1.</u>	—page 60
3.8.1 - <u>TBP Related Factor 2.</u>	—page 61
3.8.3 - <u>TBP Related Factor 3.</u>	—page 64
3.8.4 - <u>TBP Related Factor 4.</u>	—page 64

IV PRESENTATION SUCCINCTE des ELEMENTS SUB-NUCLEAIRES

4.1) Structure Général du Noyau Interphasique des Eucaryotes.	—page 66
4.1.1 - <u>L'Enveloppe Nucléaire.</u>	—page 66
4.1.2 - <u>Ultra-Structure de la Matrice Nucléaire ou Caryosquelette.</u>	—page 68
4.1.3 - <u>Fonction du Caryosquelette.</u>	—page 69
4.2) Principaux Corpuscules Nucléaires.	—page 71
4.2.1 - <u>Les Corps de Cajal.</u>	—page 71
4.2.2 - <u>Les Corps Jumeaux des Corps de Cajal.</u>	—page 72
4.2.3 - <u>Les Amas Granulaires Interchromatiniens.</u>	—page 73
4.2.4 - <u>Les Corps Leucémiques Promyélocitaires.</u>	—page 73
4.2.5 - <u>Le Nucléole.</u>	—page 74

TRAVAUX de THESE

I VARIATIONS dans l'EXPRESSION et la LOCALISATION CELLULAIRES de TRF2

- 1.1) Présentation de l'Etude Réalisée sur TRF2. —page 78
- 1.2) Notre Anticorps est Bel et Bien Spécifique de TRF2. —page 80
- 1.3) Publication. —page 82
- 1.4) Résultats Supplémentaires. —page 83
- 1.5) De Frustrants Echecs. —page 85
- 1.6) TRF2, Graine de la Discorde. —page 88
- 1.7) 2A1, un AntiCorps Malicieux. —page 89
- 1.8) TRF2 & TFIIA, « *Je t'aime, moi non plus* » —page 91
- 1.9) TRF2 et Jun, Amis ou Ennemis ? —page 92

II ANALYSE STRUCTURE-FONCTION de TBP *in vivo*.

- 2.1) Etude Préliminaire par Transfections Transitoires. —page 100
- 2.2) Elaboration de Transfectants Stables *mtbp^{lox/-}* pour hTBP. —page 102
- 2.3) Elimination du TBP Endogène. —page 105
- 2.4) Des Résultats Préliminaires Déroutants. —page 108
- BIBLIOGRAPHIE —page 112
-

Listes Des Tableaux & Figures

Figure I_1	– Le Promoteur des Gènes de Classe II–	<i>page 5</i>
Tableau I_A	– Les sous-unités des ARN Polymérase II humaines et de Levure. –	<i>page 7</i>
Figure I_2	– Structure Cristallographique de l'ARN Polymérase II –	<i>page 8</i>
Figure I_3	– Le CTD au Cours de la Transcription –	<i>page 11</i>
Figure I_4	–Modélisation du Complexe Quaternaire ADN/TBP/TFIIA/IIIB de levure–	<i>page 14</i>
Figure I_5	– Modélisation de la structure d'ALF –	<i>page 15</i>
Figure I_6	– Intégration de TFIIE & TFIIIF dans le PIC –	<i>page 18</i>
Tableau I_B	– Les Sous-Unités de TFIIH –	<i>page 20</i>
Figure I_7	– Structure Tridimensionnelle de TFIIH par Cryo-Electro-Microscopie –	<i>page 20</i>
Figure I_8	– Localisation des Eléments qui Contactent le Promoteur –	<i>page 22</i>
Figure I_9	– TFIIS régule la pol.II via son canal secondaire –	<i>page 23</i>
Figure I_10	– Le Médiateur, Structure & Composition –	<i>page 26</i>
Tableau II_A	– La Nomenclature des TAFs –	<i>page 31</i>
Figure II_1	– Le Repliement du Type Histone dans les TAFs –	<i>page 33</i>
Figure II_2	– TFIID sous Microscope Electronique –	<i>page 34</i>
Figure II_3	– Structure de B-TAFIID –	<i>page 39</i>
Figure III_1	– Modèles de fonctionnement de la partie aminoterminal de TBP –	<i>page 41</i>
Figure III_2	– Structure de la région conservée de TBP –	<i>page 43</i>
Figure III_3	– La Transcription par l'ARN Polymérase I –	<i>page 45</i>
Figure III_4	– Les Promoteurs des gènes transcrits par l'ARN Polymérase III –	<i>page 48</i>
Figure III_5	– Cartographie des Sites d'Interactions de TBP –	<i>page 52</i>
Figure III_6	– Alignement de Séquence Entre Orthologues & Paralogues de TBP –	<i>page 54</i>
Figure III_7	– Vue stéréoscopique du TBP _{sp3} humain –	<i>page 55</i>
Tableau III_A	– Mutagenèse Systématique Des Résidus de la Face Convexe du TBP par O.Bryant & al. –	<i>page 57 & 58</i>
Figure III_8	– Etude de l'interaction TBP/TFIIA, TBP/TFIIB par Alanine Scanning –	<i>page 60</i>
Figure III_9	– TBP et ses paralogues –	<i>page 63</i>

Figure IV_1	– L’Interface Cytoplasme/Nucléoplasme –	page 67
Figure IV_2	– La Matrice Nucléaire Interne –	page 69
Figure IV_3	– Organisation des Territoires Génomiques lors de la Mitose et pendant l’Interphase –	page 70
Figure IV_4	– Les Corps de Cajal en Microscopie Electronique –	page 72
Figure IV_5	– Les Speckles –	page 73
Figure IV_6	– Les PML-NBs –	page 74
Figure IV_7	– UltraStructure du Nucléole –	page 75
Figure IV_8	– Biogenèse des Ribosomes –	page 76
Figure R-1	– Expression de TRF2 au cours de la Spermatogenèse –	page 79
Figure R-2	– ImmunoLocalisation de TRF2 –	page 81
Figure R-3	– TRF2 est Sensible au Peroxyde d’Hydrogène et à l’Anisomycine –	page 83
Tableau R-A	– Traitements Appliqués aux Cellules HeLa –	page 84
Figure R-4	– Immunoprécipitation de la Protéine de Fusion flag-hTRF2 –	page 84
Figure R-5	– Des ARNs Gouverneraient-ils le Noyau ? –	page 86
Figure R-6	– Localisation de l’Epitope de l’Anticorps Anti-TRF2 : 2A1 –	page 90
Figure R-7	– TRF2 dans les Voies de Signalisations des SAPKs –	page 93
Figure R-8	– Stratégie d’inactivation conditionnelle de TBP chez la Souris –	page 96
Tableau R-B	– Synthèse des Caractéristiques <i>in vitro</i> des Mutants Etudiés –	page 98
Figure R-9	– Procédures Expérimentales –	page 99
Figure R-10	– Etude de Complémentation Par Transfections Transitoires –	page 101
Figure R-11	– Genèse de Rétrovirus MMuLV –	page 104
Figure R-12	– Inactivation du second allèle de TBP –	page 105
Figure R-13	– Fibroblastes mTBP ^{-/-} Exprimant de Manière Stable un TBP Exogène Sauvage ou Muté –	page 106
Figure R-14	– Analyse de la Prolifération Cellulaire : Lignées Contrôles –	page 108
Figure R-15	– Analyse de la Prolifération Cellulaire des Lignées privées de TBP Endogène –	page 109

AVANT-PROPOS

L'expression du génome des cellules eucaryotes repose sur la transcription de trois classes de gènes :

Les gènes dit de classe I, codent pour les ARN ribosomiques 28S, 18S et 5,8S qui sont des constituants structurels et fonctionnels des ribosomes.

Les gènes dit de classe II, codent pour certain des petits ARN nucléaires (snRNA) et pour les ARN messagers qui sont traduits par les ribosomes en protéines.

Les gènes, dit de classe III, codent entre autres, pour l'ARN ribosomique 5S et pour les ARNt de transfert qui sont aussi impliqués dans la traduction.

A chaque classe d'ARN correspond une classe de gène et une **ARN polymérase ADN dépendant**. Le mécanisme d'**initiation de la transcription** varie d'une polymérase à l'autre. L'initiation de la transcription des gènes de classe I nécessite la reconnaissance du promoteur par le complexe **SL1**. La polymérase II, pour identifier son site d'initiation, fait appel à un assemblage complexe de facteurs généraux de transcription. La liaison du facteur général de transcription **TFIID** au promoteur est l'événement par lequel débute cet assemblage. Les mécanismes d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase III sont multiples mais nécessitent tous le recrutement de cette enzyme par **TFIIB**.

Ces trois éléments SL1, TFIID & TFIIB, qui occupent des places clefs lors de l'initiation de la transcription, sont des **complexes macromoléculaires** contenant au moins quatre sous-unités pour SL1, une quinzaine pour TFIID et trois sous-unités pour TFIIB.

Malgré cette diversité, ces complexes renferment toujours la protéine **TBP** (*TATA Binding Protein*). Cette protéine est capable de lier spécifiquement l'ADN au niveau de l'**élément TATA** du promoteur et dirige l'initiation de la transcription de nombreux gènes, quelque soit leur classe. TBP a été de ce fait considéré comme le facteur « **universel** » de la transcription.

La découverte de protéines apparentées à TBP a néanmoins fait évoluer ce concept. La protéine **TRF2** (*TBP Related Factor-2*) est un des **paralogues** de TBP qui semble plus

spécifiquement voué à la transcription des gènes de classe II. Ce facteur intervient dans divers processus selon la place dans l'évolution de l'organisme considéré. Il est impliqué dans la transcription d'un sous-ensemble de gènes de classe II lors du démarrage de la transcription zygotique chez *C. elegans*, *X. leavis* ou *D. rerio.*, il a également des fonctions primordiales lors de l'embryogenèse de la Drosophile puisqu'il intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Chez les mammifères, TRF2 est exprimé dans les cellules méiotiques au niveau cytoplasmique et/ou nucléaire suivant le type cellulaire. Les souris invalidées pour TRF2 arrivent à terme mais les mâles sont stériles. A l'inverse des gamètes mâles murines, TRF2 adopte une **localisation très précise dans le noyau** des cellules HeLa ou Cos.

Au cours de ma thèse je me suis principalement intéressé aux variations de l'expression et de localisation de la protéine TRF2 dans différents modèles de cellules de mammifères. J'ai ainsi pu mettre en avant le rôle potentiel de TRF2 dans la prévention de l'oncogenèse.

J'ai également développé, lors de ma dernière année de thèse, un système d'étude des mutations de TBP *in vivo*. Ce dernier projet a été réalisé en collaboration avec le Dr. Pim Pijnappel du laboratoire du Dr. Marc TIMMERS dans le cadre d'un réseau « Improving Human Potential (IHP) Research Training Network » financé par la Communauté Européenne.

Avant de détailler mon travail de thèse j'essaierai de replacer ce travail dans son contexte : je décrirai d'abord les mécanismes complexes de l'initiation de la transcription des gènes de classe II et des éléments qui y participent; je rappellerai ensuite l'organisation de l'espace où la transcription à lieu, a savoir le noyau cellulaire.

INTRODUCTION

I

L'INITIATION de la
TRANSCRIPTION
des GENES de CLASSE II

I L'INITIATION de la TRANSCRIPTION des GENES de CLASSE II

Au sein d'un organisme, une cellule eucaryote est amenée à intégrer une multitude de signaux extérieurs afin d'assurer le développement et la pérennité de l'ensemble macrocellulaire auquel elle appartient. Pour cela, la cellule eucaryote doit gérer au mieux l'information génétique qu'elle possède en son noyau. La transcription est l'un des mécanismes par lequel la cellule va utiliser son patrimoine génétique pour répondre aux sollicitations de son environnement. La transcription des gènes de classe II est l'étape initiale et indispensable à toute synthèse de protéine par une cellule. Ces protéines constituent plus de la moitié de la masse sèche cellulaire et leur production est capitale pour la viabilité, la croissance et le développement de la cellule.

Chez les euPcaryotes, la transcription des gènes de classe II nécessite le recrutement d'une multitude de facteurs protéiques. Au cœur de ce mécanisme de transcription se trouve l'ARN polymérase II ADN dépendante (*pol.II*), complexe multiprotéique de 0,5MDa qui, comme son nom l'indique, transcrit l'ADN en ARN. Seule, la *pol.II* est incapable d'initier la transcription d'un gène. Les facteurs généraux de transcription (*GTFs : General Transcription Factors*) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH, sont indispensables à ce processus. En effet, en s'associant à la région promotrice d'un gène de classe II ces *GTFs* échafaudent un complexe de pré-initiation (*PIC : PreInitiation Complex*) qui assurera à la *pol.II* la reconnaissance et la liaison à ce promoteur. (*cf. Fig.I_1*)

1.1) Les Promoteurs des Gènes de Classe II.

Le promoteur se définit comme la région de l'ADN qui dirige la transcription d'un gène. Dans les promoteurs de classe II, le promoteur minimal se compose souvent d'un élément TATA et/ou d'un élément initiateur (*Inr*). Un élément promoteur en aval du site d'initiation de la transcription (*DPE : Downstream Promoter Element*) peut également jouer de concert avec l'*Inr* pour initier la transcription.

En plus des éléments du promoteur minimal, le promoteur proximal contient des séquences régulatrices, l'élément de réponse à TFIIB (*BRE : TFIIB Responsive Element*) par exemple, qui activent ou répriment la transcription.

Les séquences régulatrices distales situées à plusieurs centaines de bases en amont ou en aval du promoteur minimal sont constituées d'éléments enhancer ou silencer suivant leur effet positif ou négatif sur la transcription.

1.1.1 - Le Promoteur Minimal.

L'Elément TATA

Découvert en a la fin des années 80 suite à la comparaison des régions 5' non codantes de gènes viraux, de Drosophiles et de mammifères (Breathnach and Chambon, 1981), l'élément TATA ou boîte TATA a été la première séquence identifiée dans les promoteurs des gènes codant des protéines. La boîte TATA se situe entre 25 à 30 nucléotides en amont du site initiation de la transcription, elle constitue le site de liaison à la sous-unité TBP (TBP : *TATA binding Protein*) du facteur général de transcription TFIID. TFIID lié au promoteur *via* la boîte TATA va médier la formation du PIC et ainsi promouvoir l'initiation de la transcription.

Une séquence consensus pour cet élément est difficile à définir. La boîte TATA canonique - TATA[T/A]AA[G/A] - n'est, en effet, présente que dans 32% des gènes de classe II chez l'Homme (Suzuki et al., 2001), ceci définissant des promoteurs TATA-dépendants et TATA-indépendants. Il semblerait qu'une grande variété de séquences riches en A/T puisse remplir les mêmes fonctions que la boîte TATA et supporter la mobilisation de TBP au niveau du promoteur (Zenzie-Gregory et al., 1993). En effet, des régions riches en A/T, qui remplissent ces fonctions tout en étant très différentes de la boîte TATA canonique ont également été décrites dans un grand nombre d'organismes, des archéobactéries (Bell and Jackson, 2001) aux protistes supérieurs (Purdy et al., 1996),

L'Elément Initiateur (Inr)

L'élément initiateur est une séquence riche en pyrimidine qui entoure le site d'initiation de la transcription. La séquence consensus humaine de l'Inr est - Py Py A₍₊₁₎ N [T/A] Py Py -. Ici, A₍₊₁₎ correspond au premier nucléotide transcrit par la pol.II ; la position des Pyrimidines (Py) en -2 ; +4 & +5 est absolument nécessaire au bon fonctionnement de l'Inr. La comparaison de 1941 promoteurs minimaux de Drosophile a montré que l'Inr est présent dans 69% d'entre eux (Ohler et al., 2002).

L'Inr focalise le début de la synthèse du pré-ARNm au niveau de l'Adénine+1. L'Inr participe à la polarisation du promoteur. Néanmoins, tout comme la boîte TATA, la présence d'une séquence inversée de cet élément dans des promoteurs synthétiques ne permet pas d'inverser la direction de transcription mais diminue la force du promoteur.

L'Inr est un élément indépendant à la boîte TATA, mais dans les promoteurs TATA-dépendants il peut agir de concert avec cette dernière pour augmenter l'efficacité de l'initiation de la transcription, cela quand la distance TATA/Inr est inférieure à 25pb (O'Shea-Greenfield and Smale, 1992). Il apparaît en outre que dans de tels promoteurs, l'Inr confère à l'élément TATA une insensibilité au régulateur de transcription hétérodimérique NC2 (*NC2 : Negative Cofactor 2*). NC2 est connu pour réguler négativement la transcription lorsqu'il se lie à l'élément TATA. La transcription à partir de promoteurs artificiels dans des extraits nucléaires déplétés en NC2 endogène est toujours active quand on ajoute du NC2 recombinant si ces promoteurs contiennent à la fois un élément TATA et un Inr ; dans des conditions identiques, la transcription de ces mêmes promoteurs sans Inr s'arrête (*communication personnelle de Barbora MALECOVA, équipe du Dr. Thomas OELGESCHLAGER, Marie Curie Research Institute, The Chart, Oxted, Surrey RH8 0TL, United Kingdom*)

TFIID est essentiel pour l'activité des Inr de promoteurs TATA dépendant. Les facteurs TAF1 (hTAF_{II}250) et TAF2 (hTAF_{II}150), deux des 14 facteurs associées à TBP (*TAFs : TBP Associated Factors*) contenus dans TFIID, interagissent directement avec l'Inr. Par ailleurs le complexe trimérique TBP/TAF1/TAF2 est suffisant pour initier la transcription au niveau de l'Inr des promoteurs TATA dépendants (Verrijzer et al., 1995) et ce, même si la présence du facteur général de transcription TFIIA stabilise fortement la liaison de TFIID à l'Inr (Emami et al., 1997). Alors que la liaison du complexe TFIIA/TFIID est très faible sur les promoteurs comportant uniquement un Inr.

D'autres facteurs sont aussi capables d'initier la transcription en se liant à l'Inr, TFII-I pour le gène qui code le récepteur V β 5.2 des lymphocytes T (Roy, 2001) ; la protéine à doigt de zinc YY-1 au niveau du promoteur P5 des virus défectifs (*Adeno-Associated Virus : AAV*) (Seto et al., 1991) etc...

L'Elément DPE

Initialement identifié dans le promoteur des gènes *Antennapedia* P2 et *jockey* de drosophile, le DPE est typiquement mais non exclusivement trouvé dans les promoteurs TATA-indépendants. De séquence consensus - [A/G] G [A/T] [C/T] [G/A/C] -, le DPE permet, en synergie avec l'Inr, le recrutement de TFIID au niveau du promoteur.

Le DPE est fonctionnellement dépendant de l'Inr. A l'inverse de la boîte TATA qui est un composant autonome du promoteur et suffisant pour initier la transcription, le DPE est inefficace en absence d'Inr. Le DPE et l'Inr peuvent être considérés comme faisant parti du même élément du promoteur, qui se situe exactement à 28 nucléotides en aval de l'Adénine+1 de l'Inr. Toute modification de cette distance, ne serait ce que d'un nucléotide, entraîne la perte de la liaison de TFIID au promoteur (Kutach and Kadonaga, 2000).

L'interaction entre TFIID et le DPE s'effectue *via* TAF6 (hTAF_{II}80) et TAF9 (hTAF_{II}31). Le régulateur de transcription hétérodimérique NC2 est également capable de reconnaître le DPE. NC2 est un régulateur négatif de la transcription lorsqu'il se lie à l'élément TATA en absence d'Inr ; lié au DPE, ce facteur active en revanche l'initiation de la transcription. Il semblerait que ces fonctions de régulation positive ou négative de la transcription soient indépendantes l'une de l'autre, ce qui définit NC2 comme un facteur multifonctionnel (Kadonaga, 2002).

Autres Eléments du Promoteur Minimal

Diverses séquences régulatrices de l'activité du promoteur ont été décrites. Sous représentées dans le génome, ces séquences semblent être restreintes à des fonctions très spécifiques. C'est le cas par exemple du DCE (*DCE : Downstream core element*) présent du nucléotide +10 à +45 du gène de la β -globine humaine. Le DCE faciliterait la liaison de TFIID au promoteur (Lewis et al., 2000). De même, le gène humain de la protéine gliale acide et fibreuse (*gfa : glial fibrillary acidic protein*) possède une séquence spécifique en aval du site d'initiation qui est impliquée dans la liaison et l'activité de TFIID (Nakatani et al., 1990).

Il existe enfin des séquences en aval du site d'initiation de la transcription de gènes TATA-indépendants présentant de multiples sites d'initiation de la transcription (*MEDI : Multiple start site downstream element*) qui régulent aussi la transcription de ces gènes (Rudge and Johnson, 1999). Ces éléments peuvent être considérés comme faisant partie du promoteur minimal puisqu'ils suffisent à établir une transcription basale.

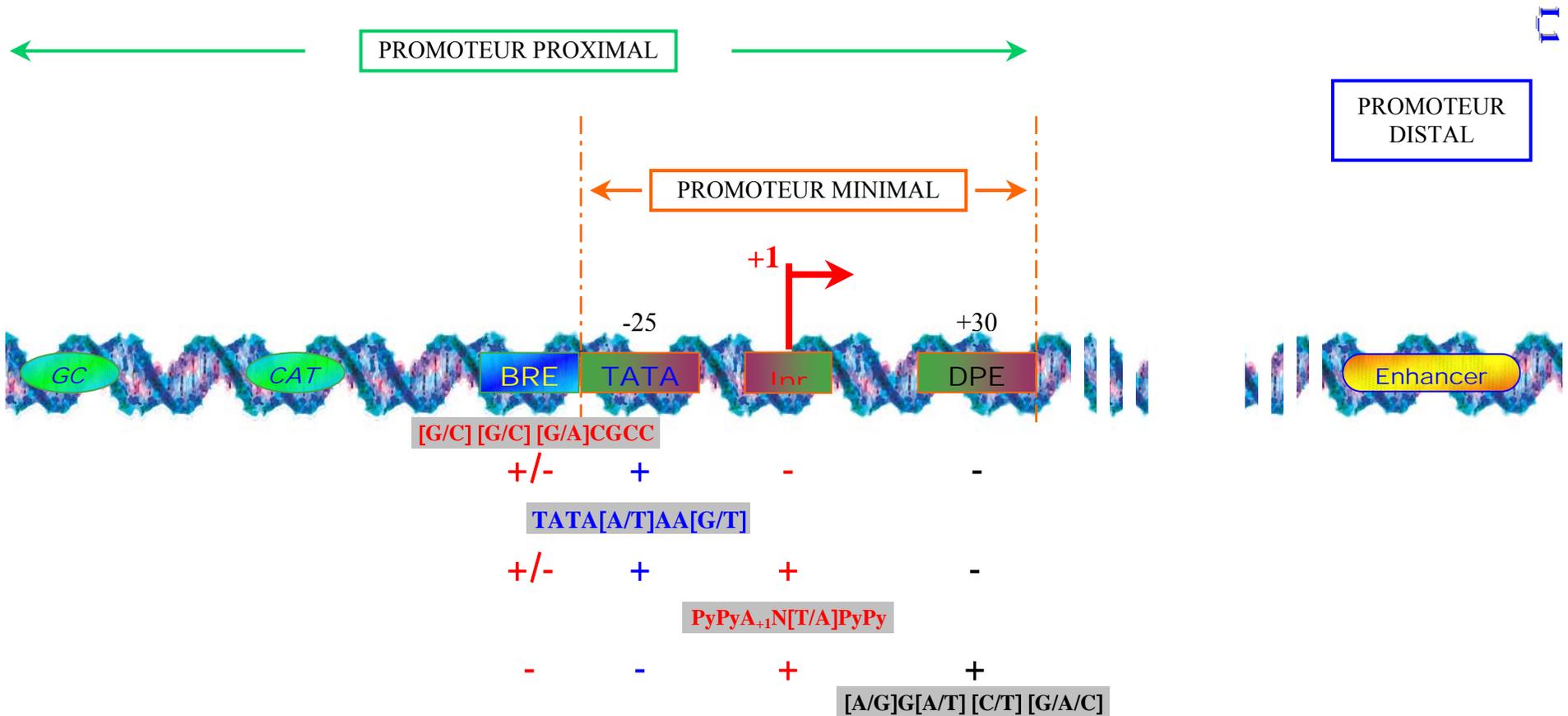


Figure I_1

- Le Promoteur des Gènes de Classe II -

Le promoteur se définit comme la région de l'ADN qui dirige la transcription d'un gène. Dans les promoteurs de classe II, le promoteur minimal se compose généralement d'un élément TATA et/ou d'un élément initiateur (Inr). Un downstream promoteur element (DPE) peut également jouer de concert avec l'Inr pour initier la transcription.

En plus des éléments du promoteur minimal, le promoteur proximal contient des séquences régulatrices qui ont un effet activateur, ou répresseur sur la transcription. L'élément BRE (TFIIB Responsive Element) présent dans 12% des promoteurs à boîte TATA est reconnu spécifiquement par le facteur TFIIB.

Les séquences régulatrices distales situées à plusieurs centaines de bases en amont ou en aval du promoteur minimal sont constituées d'éléments enhancer ou silencer selon leur effet positif ou négatif sur la transcription.

1.1.2 - Le Promoteur Proximal.

L'Élément de Reconnaissance à TFIIB

L'élément de reconnaissance à TFIIB (*BRE: TFIIB Responsive Element*) est généralement un motif de 7 nucléotides placé immédiatement en amont de l'élément TATA dont la séquence consensus humaine est - [G/C] [G/C] [G/A] C G C C - (Lagrange et al., 1998). Le BRE est reconnu par le facteur général de transcription TFIIB grâce au motif Hélice-tour-Hélice de sa partie C-terminale. Étrangement, même si le BRE se retrouve dans les promoteurs d'archéobactéries, aucune séquence similaire n'a été identifiée chez la Levure. Le rôle du BRE serait en fait différent chez les archéobactéries. Dans ce cas le BRE améliore significativement l'assemblage du complexe de pré-initiation alors que chez les eucaryotes son rôle est plus complexe. Si le BRE humain a été initialement décrit comme stimulant la transcription pol.II *in vivo*, il a été rapporté par la suite que le BRE pouvait réprimer le niveau basal de transcription *in vitro* et *in vivo* (Evans et al., 2001). Sa fonction reste donc encore mal définie.

Autres Séquences Régulatrices Proximales

Chez les métazoaires il existe de nombreuses séquences, en amont de la boîte TATA, reconnues par divers régulateurs transcriptionnels. Habituellement situées entre les positions -110 et -40, elles peuvent être composées de site de fixation à divers facteurs. Ces séquences perdent rapidement leur effet cis-régulateur quand elles sont trop éloignées du site d'initiation de la transcription (Mitchell and Tjian, 1989).

Les plus connues parmi ces séquences régulatrices proximales sont les éléments CCAAT et GGGCGG. La boîte CCAAT est souvent localisée entre 60 à 80 nucléotides en amont du site d'initiation, elle constitue un élément de liaison au facteur nucléaire Y (*NF-Y: Nuclear Factor-Y*) (Mantovani, 1999). La boîte GGGCGG, de séquence consensus - [G/T] G G G C G G [G/A] [G/A] [C/T] -, est positionnée en amont du promoteur minimal et reconnue par des facteurs de transcription de la famille Sp1 *via* leurs motifs doigt de zinc C-terminaux (Marco et al., 2003).

Un grand nombre d'autres séquences, impliquées dans la réponse transcriptionnelle à des signaux spécifiques, peuvent composer le promoteur proximal. Comme c'est le cas pour l'élément de réponse aux cytokines, la boîte ISRE (*IFN Stimulatory Response Element*), ou bien l'élément de réponse à des signaux hormonaux, la boîte RARE (*Retinoic Acid*

Responsive Element), ou encore l'élément de réponse à des facteurs de croissance, la boîte SRE (*Serum Responsive Element*).

1.1.3 - Les Îlots CpG.

Le génome humain contient environ 29000 éléments extrêmement riches en répétition du dinucléotide CG. Nommés îlots CpG, leur longueur varie entre 0,5 & 2 kpb. Bien que ces îlots CpG ne constituent pas à proprement parler une région promotrice, force a été de constater qu'environ la moitié des promoteurs de gènes codant pour des protéines sont associés à ces îlots (Antequera and Bird, 1993). Le mode de fonctionnement de ces séquences restent toutefois obscure. Dans la majorité des cas, les îlots CpG ne comportent ni boîte TATA, ni Inr, ni DRE ni aucun élément décrit comme impliqué dans la transcription. Il a néanmoins été observé de multiples sites de liaison à Sp1, entre 40 et 80 nucléotide en aval du site d'initiation des promoteurs associés aux îlots CpG (Blake et al., 1990), ce qui suggère que Sp1 serait directement impliqué dans la formation du complexe de pré-initiation de tels promoteurs.

1.1.4 - Le Promoteur Distal.

Les séquences distales sont généralement spécifiques du gène considéré et sont appelées « enhancers » lorsqu'elles sont des sites de liaison d'activateurs transcriptionnels ou « silencer » lorsqu'elles sont des sites de liaison de répresseurs transcriptionnels. Les séquences distales sont le plus souvent composées d'un nombre important de séquences régulatrices regroupées, capables de réguler toute une région chromosomique. Deux modèles ont été imaginés pour expliquer la régulation de la transcription par ces séquences. Un premier modèle dit de « bouclage » (*looping*) suggère que l'ADN va se courber pour permettre un contact entre les activateurs fixés sur les régions régulatrices et les facteurs de base de la transcription fixés sur le promoteur proximal. Le modèle dit de « liaison » (*linking*) suggère quant à lui que les régions de contrôle vont permettre d'échafauder une structure chromatinienne, activatrice ou inhibitrice, laquelle se propage jusqu'au gène à réguler (Bulger and Groudine, 1999).

1.2) L'ARN Polymérase II ADN Dépendante.

La pol.II est le complexe multiprotéique qui porte l'activité catalytique du PIC (*PreInitiation Complex*) en charge de la synthèse de tous les ARNm nucléaires et de quelques snARNs. De masse supérieur à 0,5MDa, la pol.II contient douze sous-unités, nommées, RPB 1 à 12 (*RNA Polymerase B*, cf. *Tbl.I_A ci-dessous*). Les deux plus larges sous-unités, Rpb1 et Rpb2, sont les homologues respectives des sous-unités β' et β des ARNs polymérase bactériennes. Rpb3 & 11 sont similaires à la sous-unité bactérienne α , Rbp6, au facteur procaryotique ω (Minakhin et al., 2001).

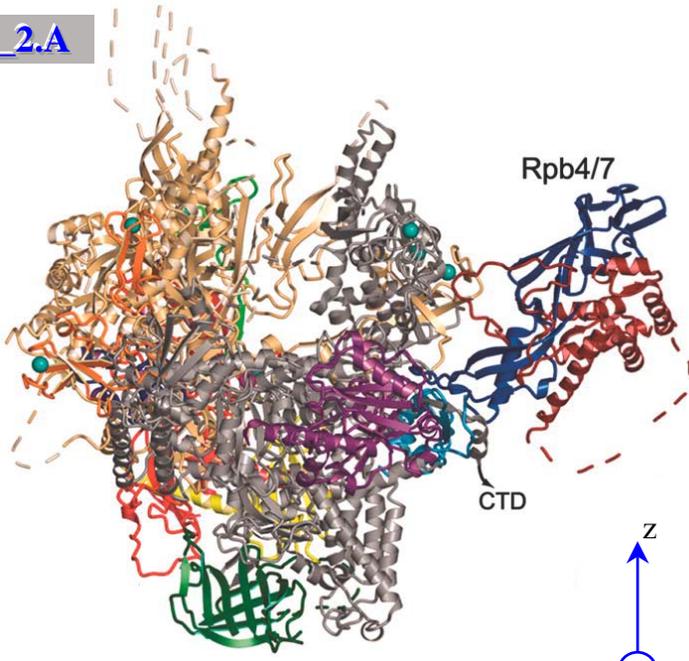
Les sous-unités Rpb5, 6, 8, 10 & 12 sont communes aux trois ARN polymérase eucaryotiques, la conservation de ces éléments au cours de l'évolution suggère qu'ils possèdent certaines fonctions communes à toutes les ARN polymérase; alors que les protéines Rpb4, 7 & 9 sont spécifiques de la pol.II. Des études chez la Levure montrent que toutes les sous-unités, à l'exception de Rpb4 & 9, sont essentielles pour la viabilité des cellules. Cependant même si Rpb4 & 9 ne sont pas nécessaire à l'activité catalytique de la pol.II, la délétion de ces deux éléments induit des défauts de croissances et un phénotype thermosensible (Woychik and Young, 1989).

Sous-unités	Taille (AA)	MM (Da)	Localisation chromosomique	Homologues de levure	Similarités (%)
hRPB1	1970	217 205	17p13	RPB1	55
hRPB2	1174	133 896	4q12	RPB2	61
hRPB3	275	31 405	16q13-21	RPB3	45
hRPB4	142	16 337	2q21	RPB4	31
hRPB5	210	24 553	19p13.3	RPB5	45
hRPB6	127	14 478	22q13.1-2	RPB6	60
hRPB7	172	19 294	11q13.1	RPB7	43
hRPB8	150	17 143	3q28	RPB8	33
hRPB9	125	14 523	19q12	RPB9	39
hRPB10	67	7 645	11p15	RPB10	47
hRPB11	117	13 293	7q11.23 7p12.13 7q22.1	RPB11	38
hRPB12	58	7 004	8q22	RPC10	73

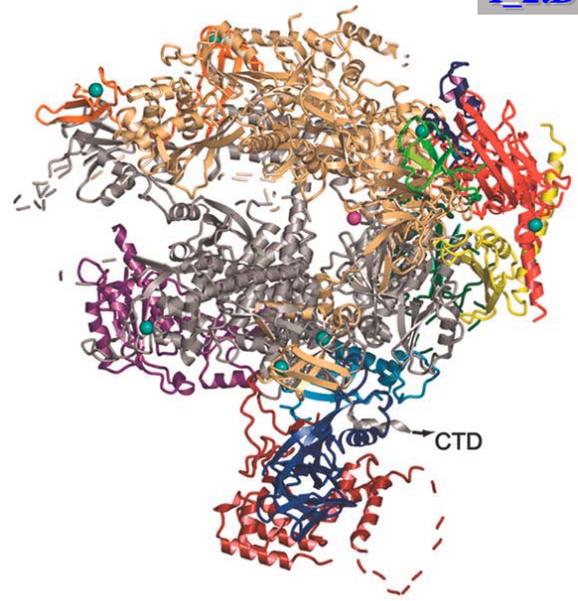
Tableau I_A : - Les sous-unités des ARN Polymérase II Humaines et de Levure. -

Les douze sous-unités de l'ARN Pol II humaine et leurs sous-unités homologues chez la Levure (S. cerevisiae). La taille en acides aminés (AA) et la masse moléculaire (MM) des différentes sous-unités sont indiquées en daltons (Da). Le taux de similarité (exprimé en pourcentage) fait état de la conservation des résidus entre ces deux espèces.

I_2.A



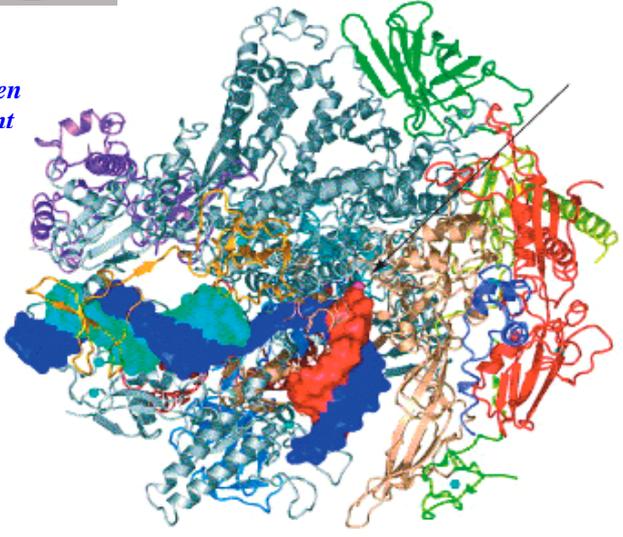
I_2.B



90°

I_2.C

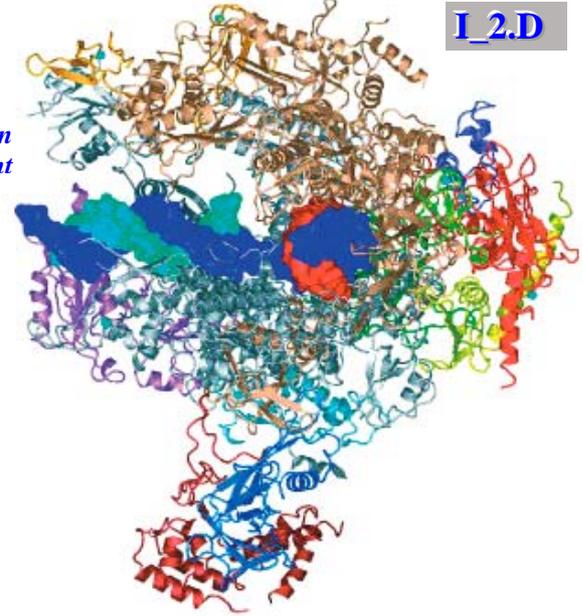
ADN en Amont



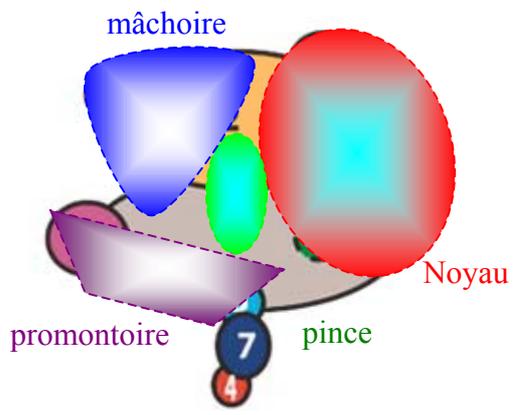
I_2.D

ADN en Amont

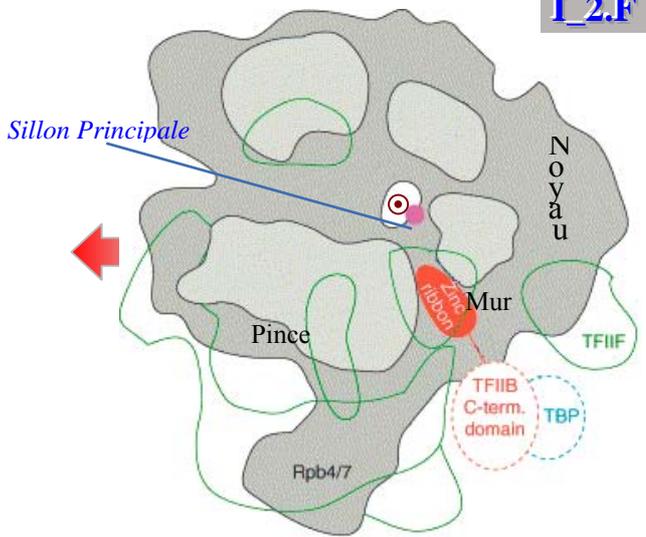
90°



I_2.E



I_2.F



1.2.1 – De la Structure à la Fonction.

La pol.II peut-être subdivisée en deux parties, une partie catalytique comprenant dix sous-unités et une partie constitué par l'hétérodimère Rpb4/Rpb7. La structure de la partie catalytique a été résolue chez la Levure, avec une résolution de 2,8Å sans ADN (Cramer et al., 2001) et à 3,3Å en cours d'élongation (Gnatt et al., 2001). Ces structures nous montrent que cette partie catalytique de la pol.II s'organise en 4 régions mobiles, le noyau (*Core* ; Rpb1, 2, 3, 8, 10, 11 & 12), les mâchoires (*Jaws* ; Rpb1, 9 & 2), la pince (*Clamp* ; extrémité N-terminale de Rpb1 et C-terminale de Rpb2) et le promontoire (*Shelf* ; Rpb 1, 5 & 6). Ces régions décrivent un sillon principal (*Cleft*) dont l'axe s'infléchit au contact du domaine de Rpb2 nommé le mur (*Wall*) ; domaine au niveau duquel se trouve le site catalytique de Rpb1. A ce même endroit s'ouvre vers l'extérieur, perpendiculairement à l'axe du sillon principale, un pore ou canal secondaire (*Secondary Channel*) en forme d'entonnoir (*Funnel*) dont les parois sont délimitées par le domaine central de Rpb1. Une hélice α de Rpb1 fait saillie dans le sillon en aval du site catalytique pour former un pont hélicoïdal (*Bridge Helix*) entre les mâchoires et la pince (*cf. fig.I_2*).

L'hétérodimère Rpb4/Rpb7 se place à la base de la pince dans une poche formée par Rpb1, 2 & 6. La protéine Rpb7 joue alors, le rôle d'une cale et réduit fortement la mobilité de cette pince (Bushnell and Kornberg, 2003) (Armache et al., 2003). Cette position détachée de l'hétérodimère par rapport à la partie catalytique, rend accessible la majeure partie de sa

Figure I_2 – Structure Cristallographique de l'ARN Polymérase II – (← ci-contre)

A – F Chaque sous unité Rpb est représentée de la même couleur dans toutes les structures présentées ici, en accord avec le schéma I_2.E.

A Structure Cristallographique de la pol.II complète (12 sous-unités), vue de face.

B Vue de dessus de la pol.II obtenu après rotation de **A** suivant z et y de 90°.

C Structure de la pol.II en cours d'élongation. Le brin transcrit de l'ADN est coloré en bleu foncé, le brin non codant en bleu clair et l'ARN néo-synthétisé en rouge. La fine flèche noire localise le site actif de l'enzyme. N.B. : Le duplexe d'ADN ne s'engage pas profondément dans le sillon principal.

D Pol.II en cours d'élongation dans la même orientation que **B**. Le duplex ADN-ARN naissant s'étend perpendiculairement au plan de la feuille.

E Représentation schématique des différentes interactions entre les sous-unités de la pol.II. Les quatre domaines mobiles de la pol.II sont précisés.

F Schéma représentant le plan médian de la pol.II dans la même orientation que **B** & **D**. L'axe du sillon principal est représenté par un trait bleu, le site actif de l'enzyme est symbolisé par un disque rose. L'entrée du canal secondaire perpendiculaire au site actif est marquée (⊙). Les projections des GTFs TBP, TFIIB & TFIIF sont représentées en bleu, rouge et vert respectivement. La flèche rouge épaisse indique le sens déplacement de la pol.II.

A, B & F adaptés de (Armache et al., 2005b)

C & D adaptés de (Armache et al., 2005a)

F adapté de (Cramer, 2004)

surface et en fait une cible de choix pour les facteurs régulant l'activité de l'ARN pol.II, par exemple la phosphatase Fcp1 (*TFIIF interacting CTD Phosphatase 1* ; (Kimura et al., 2002).

Les mâchoires et la pince sont responsables de la fixation de la pol.II à l'ADN. La rigidité introduite par Rpb4 & 7 ne permet toutefois pas d'envisager le passage d'un duplex d'ADN dans le sillon principal jusqu'au site actif, comme cela avait été décrit dans les structures cristallographiques de la partie catalytique de la pol.II de Levure. Il est plus vraisemblable que ce n'est qu'une fois que le duplex est ouvert, que le brin transcrit, chemine par ce sillon (Hahn, 2004). L'ADN épouserait la forme concave de la face interne de la mâchoire, constituée par Rbp1, pour passer ensuite au dessus du pont hélicoïdal afin d'arriver au niveau du site actif de l'enzyme. Les nucléotides triphosphate arrivent *via* le canal secondaire au site actif et un duplex ADN-ARN se forme sur une longueur de neuf paires de bases. Ce complexe est limité en aval par le pont hélicoïdal, le mur au niveau du site actif et en amont, par les éléments proximaux de la pince.

Lors de l'initiation de la transcription, il est probable que le duplex ADN-ARN naissant, de taille inférieur à neuf paire de base, soit stabilisé par le motif de liaison au zinc de TFIIB qui se situe alors entre le mur et la partie proximale de la pince (Cramer, 2004).

Le duplex ADN-ARN déstabilisé par des éléments proximaux de la pince se séparerait en amont du site actif. L'ADN suivrait alors le sillon principal et emprunterait concomitamment une sortie qui l'amènerait à proximité de l'hétérodimère Rpb4/Rpb7 avec lequel il pourrait alors interagir (Orlicky et al., 2001).

1.2.2 - L'Extrémité Carboxy-Terminale de Rpb1.

La sous-unité Rpb1 de la pol.II possède un domaine carboxy-terminal (CTD) constitué de multiples répétitions d'un heptapeptide de séquence consensus $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$. Le nombre de répétitions est variable selon les espèces et augmente avec la complexité du génome (26 à 27 répétitions pour la Levure, 52 chez les mammifères). Le CTD n'est pas essentiel à l'activité catalytique de la pol.II *in vitro*, mais sa délétion est létale chez la Levure (West and Corden, 1995), la Drosophile (Zehring et al., 1988) et dans les cellules murines (Bartolomei et al., 1988).

Le CTD de Rpb1 est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles qui vont réguler l'activité de la pol.II. Il est en effet la cible d'une phosphorylation intensive par des kinases cyclines-dépendantes (*CDK : Cyclin-Dependent Kinase*), telles que CDK7 qui, associé à la cycline H du sous complexe CAK, (*cyclin-activating kinase complex*) de TFIIH,

(cf. §1.3.6-TFIIH) phosphoryle préférentiellement la sérine 5 pendant l'initiation de la transcription (Coin and Egly, 1998). Cette sérine 5 est également le substrat privilégié du couple CDK8/cycline C qui appareillé aux sous-unités MED12 & 13 du médiateur (cf. §1.3.8-*Le Médiateur*) empêche la formation du PIC en phosphorylant le CTD (Hengartner et al., 1998). Le duo CDK9/cycline T, composant du facteur d'élongation P-TEFb, phosphoryle quant à lui essentiellement la sérine 2 du CTD au cours de l'élongation (Komarnitsky et al., 2000). La tyrosine 1 et la thréonine 4 de l'heptapeptide sont également des sites de phosphorylation mais ciblés plus rarement que les sérines.

Du fait de l'existence de déphosphorylations concomitantes, *via* des phosphatase comme Fcp1 ou encore Ssu72 qui déphosphoryle la sérine 5 pendant l'élongation (Kong et al.,

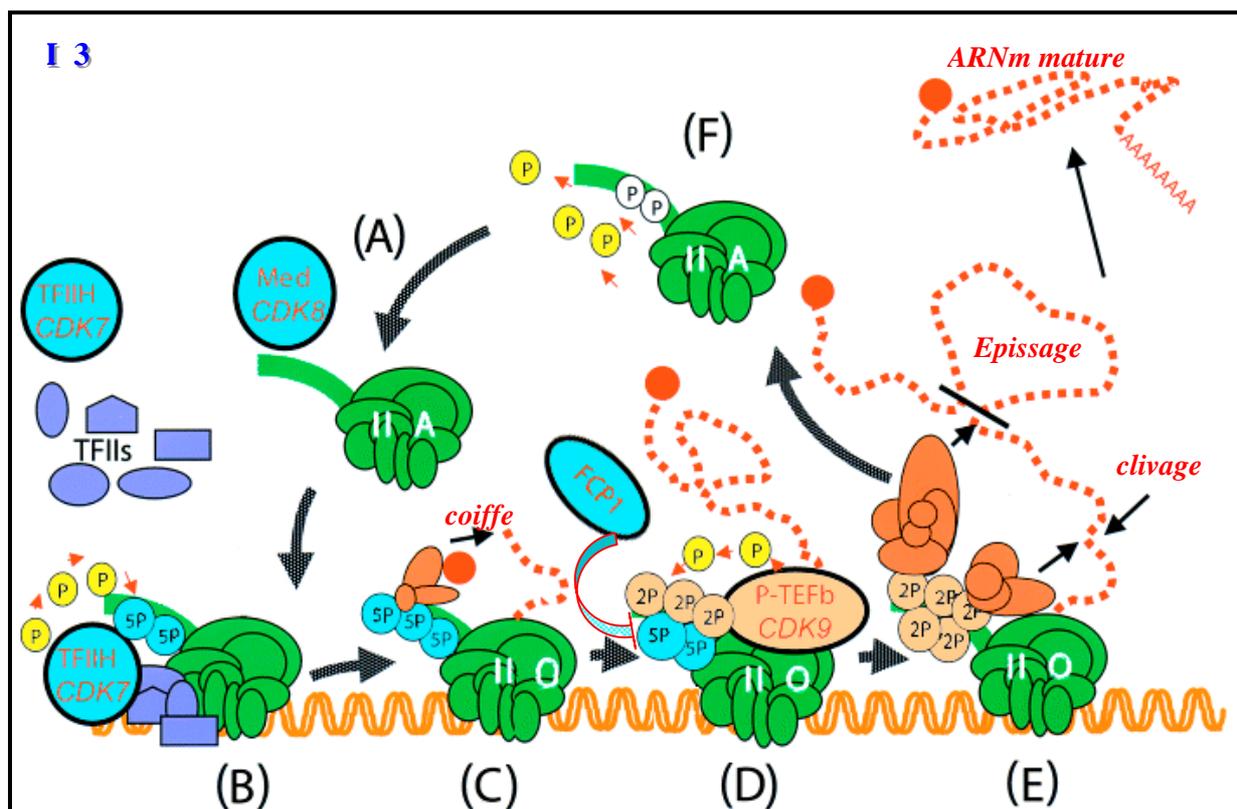


Figure I_3 – Le CTD au Cours de la Transcription –

- A** La phosphorylation du CTD IIA par CDK8 inhibe l'entrée de la pol.II dans le PIC
 - B** Lors de l'initiation de la transcription, la ser5 du CTD est phosphorylé par CDK7 ce qui facilite l'échappée du promoteur par la pol.II.
 - C** Cette phosphorylation de la ser5 favorise le recrutement des agents générant la coiffe de pré-ARNm naissant.
 - D** Au cours de l'élongation CDK9 phosphoryle la ser2 du CTD et FCP1 déphosphoryle préférentiellement la ser5.
 - E** Le CTD phosphorylé majoritairement sur sa ser2 est reconnu par les facteurs de maturation impliqués dans l'épissage, le clivage et la polyadénylation du pré-ARNm.
 - F** En fin de transcription, sous l'action des phosphatases, le CTD retourne à l'état IIA ce qui permet le recyclage de la pol.II.
- Adapté de (Palancade and Bensaude, 2003)

2005), (Krishnamurthy et al., 2004), un modèle dynamique de la phosphorylation du CTD au cours de la transcription peut être envisagé (*cf. Fig.I_3*). Le CTD de Rpb1 existerait principalement sous deux formes, une forme hypo-phosphorylée nommée IIA et une forme hyper-phosphorylée appelée IIO. La forme IIO serait capable d'interagir avec le médiateur et c'est sous cette forme que la pol.II entrerait dans le PIC. Au cours de l'initiation de la transcription, CDK7 phosphoryle la sérine 5 du CTD. Ce dernier passe ainsi sous la forme IIO ce qui facilite la libération de la pol.II hors du promoteur et permet ensuite le recrutement des facteurs impliqués dans la synthèse de la coiffe du pré-ARNm naissant (McCracken et al., 1997). Au cours de l'élongation, dans une région plus distale du gène, sous l'effet des phosphatases Fcp1, recrutée *via* Rpb4/Rpb7 (*cf. §1.2.1-De la Structure à la Fonction*) et CDK9, la phosphorylation de la sérine 2 devient majoritaire par rapport à la phosphorylation de la sérine 5 ce qui permet le recrutement des facteurs de maturation impliqués dans l'épissage, la polyadénylation et le clivage du pré-ARNm (Komarnitsky et al., 2000). Finalement, après la transcription, le CTD repasse sous forme IIA grâce à Fcp1, ce qui autorise le recyclage de la pol.II.

La phosphorylation n'est pas la seule modification du CTD puisque des O-glycosylation des sérines de l'heptapeptide ont également été observées sans que l'on sache néanmoins leur signification fonctionnelle (Kelly et al., 1993). Il y a également été proposé que la configuration *cis* ou *trans* des prolines 3 & 6 de l'heptapeptide puisse réguler la liaison au CTD de certains facteurs (Buratowski, 2003). Ainsi il semblerait qu'à l'instar des queues d'histones, il existe un « code CTD » qui permettrait la coordination et la régulation des différents événements intervenant lors de la transcription et la maturation des ARNs.

1.3) Les Rouages Initiatiques de la Transcription.

Les facteurs généraux de la transcription (GTFs) ont été isolés en tant que constituants de la machinerie basale de transcription. Le Pr. R.G. ROEDER, et ses collaborateurs ont mis en évidence que la polymérase seule est incapable d'initier la transcription et que pour ce fait elle nécessite la présence de facteurs additionnels (Roeder et al., 1976) (Weil et al., 1979). Par la suite le Pr. P. CHAMBON et ses collaborateurs ont isolé par chromatographie ces facteurs additionnels et les ont caractérisés en fonction de leur contribution au processus d'initiation de la transcription (Davison et al., 1983). L'assemblage des GTFs sur le promoteur permet une initiation spécifique de la transcription. Il s'est avéré que tous les GTFs ne sont pas

indispensables à l'initiation de la transcription et que certains n'intervenaient que comme régulateurs.

1.3.1 - TFIID.

La première étape de formation du complexe de pré-initiation est la reconnaissance du promoteur par le complexe TFIID. Ce facteur général de la transcription est un complexe multiprotéique composé de la protéine de liaison à l'élément TATA (*TBP : TATA box Binding Protein*) et de 14 facteurs associés à la TBP, les TAFs (*TBP Associated Factors*). La composition de TFIID ainsi que les séquences peptidiques de la TBP et des TAFs ont été conservées au cours de l'évolution.

La TBP est suffisante, *in vitro*, pour assurer une transcription de base. En reconnaissant la boîte TATA, la TBP permet l'encrage du TFIID au promoteur. Le fait que TBP se retrouve également dans les éléments SL1 et TFIIB impliqués dans l'initiation de la transcription des gènes de classe I & III respectivement, a amené à décrire TBP comme le facteur de transcription universel. Toutefois cette théorie a été remise en cause par la découverte de protéines apparentées à TBP nommées les TRFs (*TBP Related Factors*). Une étude plus approfondie de TBP et de ses paralogues est énoncée dans la troisième partie de cette introduction « TBP et ses PARALOGUES. »

Les TAFs ont un poids moléculaire compris entre 15 & 250kDa. Ils ne sont pas nécessaires à la transcription de base et au delà d'une simple fonction structurale. Les TAFs reconnaissent spécifiquement des éléments du promoteur, ils peuvent être des co-activateurs transcriptionnels et portent l'activité enzymatique du TFIID. Les TAFs modulent la composition du TFIID grâce à l'existence de paralogues qui sont exprimés spécifiquement dans certains tissus. Tous ces points sont repris plus en détail dans le chapitre suivant « TFIID et les TAFs. »

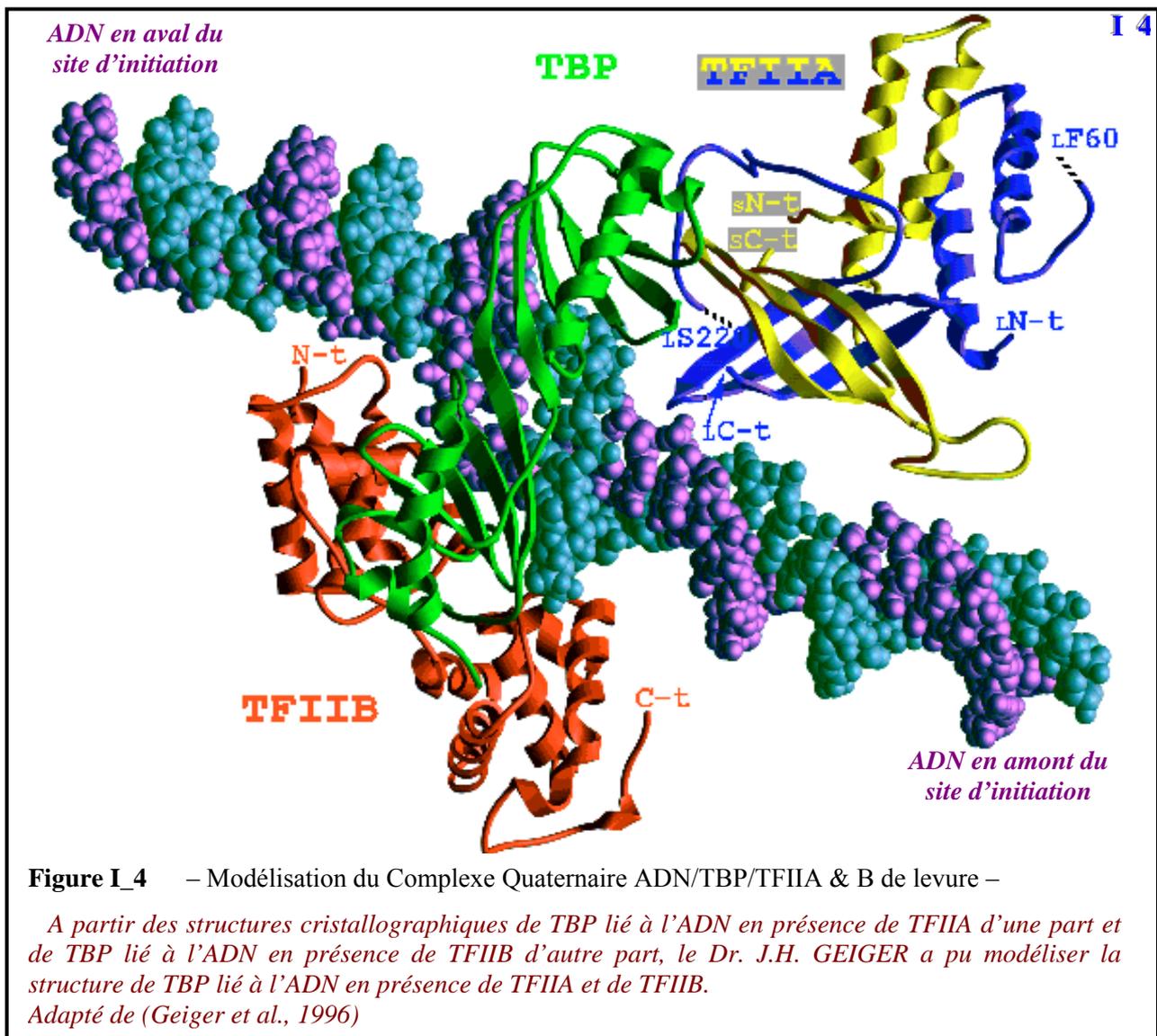
1.3.2 - TFIIA.

Chez les eucaryotes supérieurs TFIIA est un complexe multimérique constitué de 3 sous-unités α , β et γ respectivement de 30, 12 et 12kDa. Les sous-unités α et β sont générées par clivage enzymatique d'un même précurseur TFIIA $\alpha\beta$ au niveau de l'aspartate 278, 3 acides aminés en aval du motif de reconnaissance de clivage QVDG (*CRS : Cleavage*

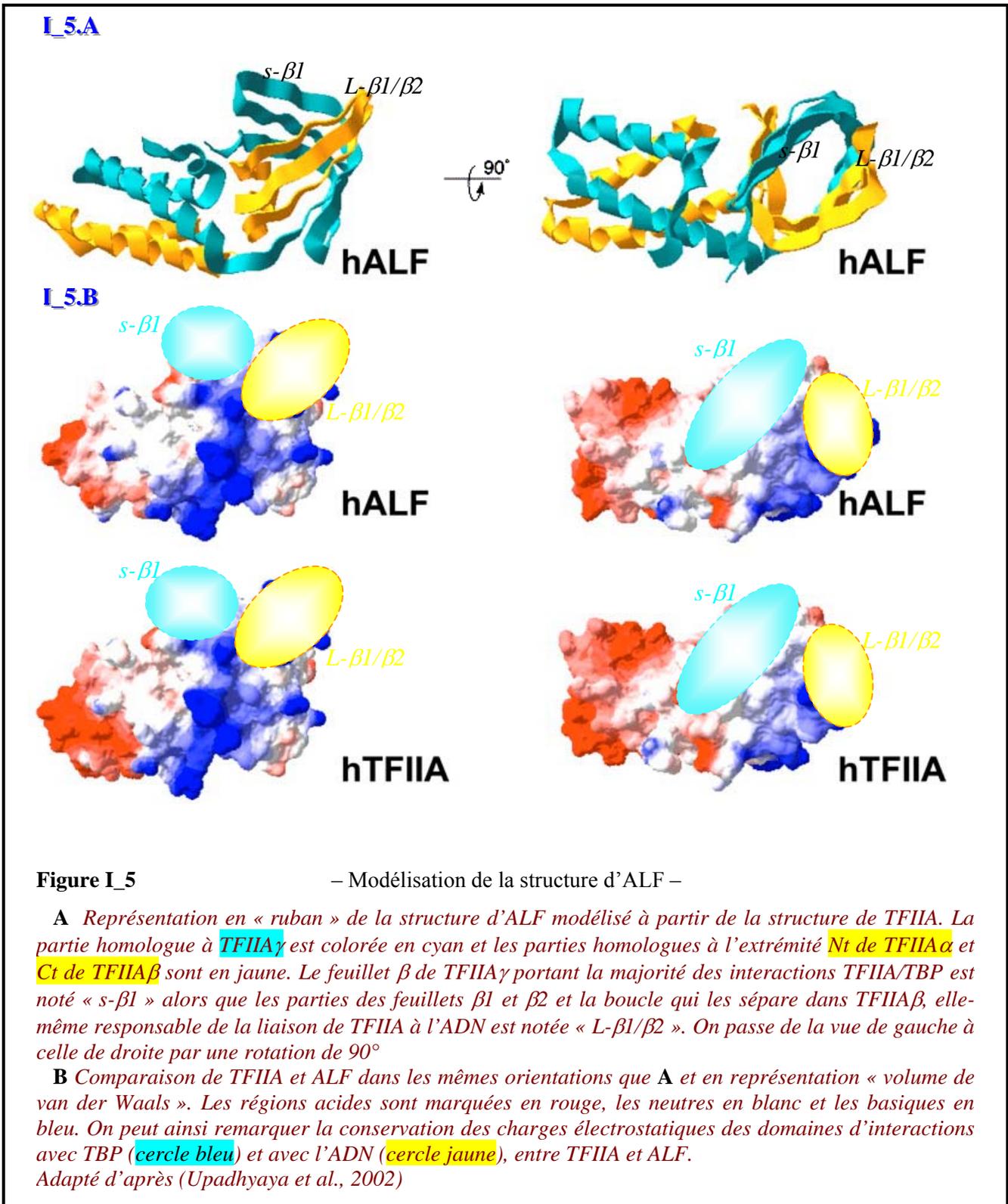
Recognition Site) (Hoiby et al., 2004). Ce clivage ne se produisant pas chez la Levure, le TFIIA de levure est donc constitué uniquement de 2 sous unités, TOA1 homologue de TFIIA $\alpha\beta$ et TOA2 homologue de TFIIA γ

Initialement décrit comme un facteur général de transcription, TFIIA n'est en fait pas indispensable à l'initiation de la transcription. TFIIA stabilise la liaison de TFIID au promoteur en établissant des contacts avec l'ADN en amont de la boîte TATA (*cf. Fig.I_4*), ainsi qu'avec TBP et TAF11 (hTAF_{II}28) (Robinson et al., 2005). TFIIA se définit plutôt comme un coactivateur de la transcription qu'il peut stimuler par compétition avec le répresseur NC2 (*cf. §1.1.1 - L'Élément DPE*). TFIIA est également un cofacteur de plusieurs activateurs de la transcription tels qu'AP-1, Sp1, PC4 et HMG-2.

Il existe un paralogue de TFIIA $\alpha\beta$ spécifique des cellules germinales. Ce facteur apparenté à TFIIA (*ALF : TFIIA Like Factor*) est capable d'interagir avec TFIIA γ , l'ADN et TBP, afin de stabiliser la liaison de TFIID au promoteur (*cf. Fig.I_5*). ALF semble également



subir un clivage enzymatique pour donner naissance à deux sous-unités ALF α et ALF β . Ce clivage ne s'effectue pas néanmoins exactement à la même position que pour TFIIA même si les acides aminés du CRS sont conservés entre les espèces (Catena et al., 2005).



1.3.3 - TFIIB.

TFIIB est un facteur monomérique essentiel à l'initiation de la transcription. Sa partie C-terminale interagit avec TBP et possède un motif hélice-tour-hélice conservé au cours de l'évolution. Ce motif permet à TFIIB de contacter directement l'ADN au niveau du grand sillon en amont de l'élément TATA et avec le petit sillon en aval du même élément (*cf. Fig.I_4*).

La partie N-terminale de TFIIB est aussi conservée au cours de l'évolution. Elle contient un motif de liaison au zinc qui permet à la pol.II *via* TFIIF de s'amarrer au PIC.

Entre ces deux régions conservées, il existe une région flexible possédant un domaine chargé, lui-même conservé (CCD : *Charged Cluster Domain*), lequel est nécessaire aux adaptations allostériques de TFIIB en fonction de la composition du promoteur sur lequel il est recruté (Fairley et al., 2002).

En plus de son rôle dans l'activation de la transcription, la reconnaissance du promoteur et du site d'initiation de la transcription, TFIIB est la cible de régulateurs de la transcription. Ces régulateurs, en se liant à TFIIB, modifient sa conformation, ce qui affecte la liaison de TFIIB au éléments du promoteur comme le BRE. Ce modèle pourrait expliquer pourquoi dans certains cas une fonction répressive est été attribué au BRE (Evans et al., 2001) (*cf. §1.1.2 - L'Elément de Reconnaissance à TFIIB*)

1.3.4 - TFIIF.

TFIIF est un hétérotétramère dont les deux sous-unités RAP30 :28kDa et RAP74 :58kDa (*RNA polymeraseII-Associating Protein* : RAP) ont été identifiées grâce à leur interaction avec la pol.II (Burton et al., 1988). TFIIF ne participe pas significativement à la sélection du promoteur mais permet l'entrée de la Pol.II dans le PIC et sa consolidation en stabilisant l'ancrage de TFIIE à TFIIH. De plus, TFIIF intervient pendant l'étape d'élongation en diminuant la fréquence des transcriptions abortives (Yan et al., 1999).

La partie N-terminale de RAP30 interagit avec la région N-terminale de RAP74 alors que sa partie centrale interagit avec la Pol.II. La partie C-terminale de RAP30 adopte un motif de liaison à l'ADN en « tête de fourchette » (forkhead ou winged-helix) similaire à celui trouvé dans le variant H5 de l'histone H1 et à celui du facteur de transcription nucléaire hépatocytaire n°3 (*HNF3 : Hepatocyte Nuclear transcription Factor 3*)

La région C-terminale de RAP74 possède également un motif en « tête de fourchette » mais, contrairement à RAP30, la répartition des charges électrostatiques dans cette partie de RAP74 ne lui permet pas de lier l'ADN. Il s'agit d'un domaine d'interaction protéine-protéine qui supporte l'interaction entre TFIIIF et la phosphatase Fcp1 (*TFIIIF-associated C-terminal domain Phosphatase* ; (Kamada et al., 2001). Fcp1 déphosphoryle le CTD de la pol.II lors de son recyclage et RAP75 est nécessaire pour stimuler cette activité alors que TFIIIB l'inhibe (Abbott et al., 2005).

RAP30 et RAP74 interagissent avec l'ADN situé en amont de la boîte TATA et en aval de l'Inr, RAP74 contacte également l'ADN entre l'élément TATA et l'Inr (*cf. Fig.I_6 & 9*). Ces données sont aisément compréhensibles si l'on imagine que le fragment d'ADN compris entre le nucléotide -50 et +40 s'enroule autour du PIC comme le laisserait supposer des données de photo-pontage et de microscopie électronique (Kim et al., 1997; Robert et al., 1998).

1.3.5 - TFIIE.

Le facteur général de transcription TFIIE stabilise le PIC en interagissant avec les autres GTFs, la Pol.II et l'ADN. TFIIE permet le recrutement et la régulation de TFIIH dans le PIC. TFIIE participe, en outre, avec TFIIIF, à l'ouverture de la double hélice d'ADN et permet à la pol.II de se dégager du promoteur et d'entrer en phase d'élongation.

Le complexe TFIIE humain est un hétérodimère constitué d'une sous-unité, TFIIE α (57kDa) et d'une sous-unité TFIIE β (34kDa). Longtemps la stoechiométrie exacte de ce complexe a été sujette à polémique, mais les clichés de microscopie électronique du Dr. SCHULTZ Patrick montrent clairement que TFIIE existe à plus de 75% sous forme de dimère (*communication personnelle du Dr. Patrick SCHULTZ, Département de Biologie et Génomique Structurales, IGBMC, France*).

La région N-terminale de TFIIE α contient un repliement en doigt de zinc qui est indispensable pour la transcription de base alors que la partie C-terminale contient une région acide qui interagit directement avec TFIIH et qui stimule son activité kinase et hélicase. Des expériences de pontages covalents ont mis en évidence que TFIIE α interagit avec l'ADN en aval de la boîte TATA au niveau du nucléotide -10 et serait important pour la stabilisation de l'ouverture de l'ADN (Forget et al., 2004).

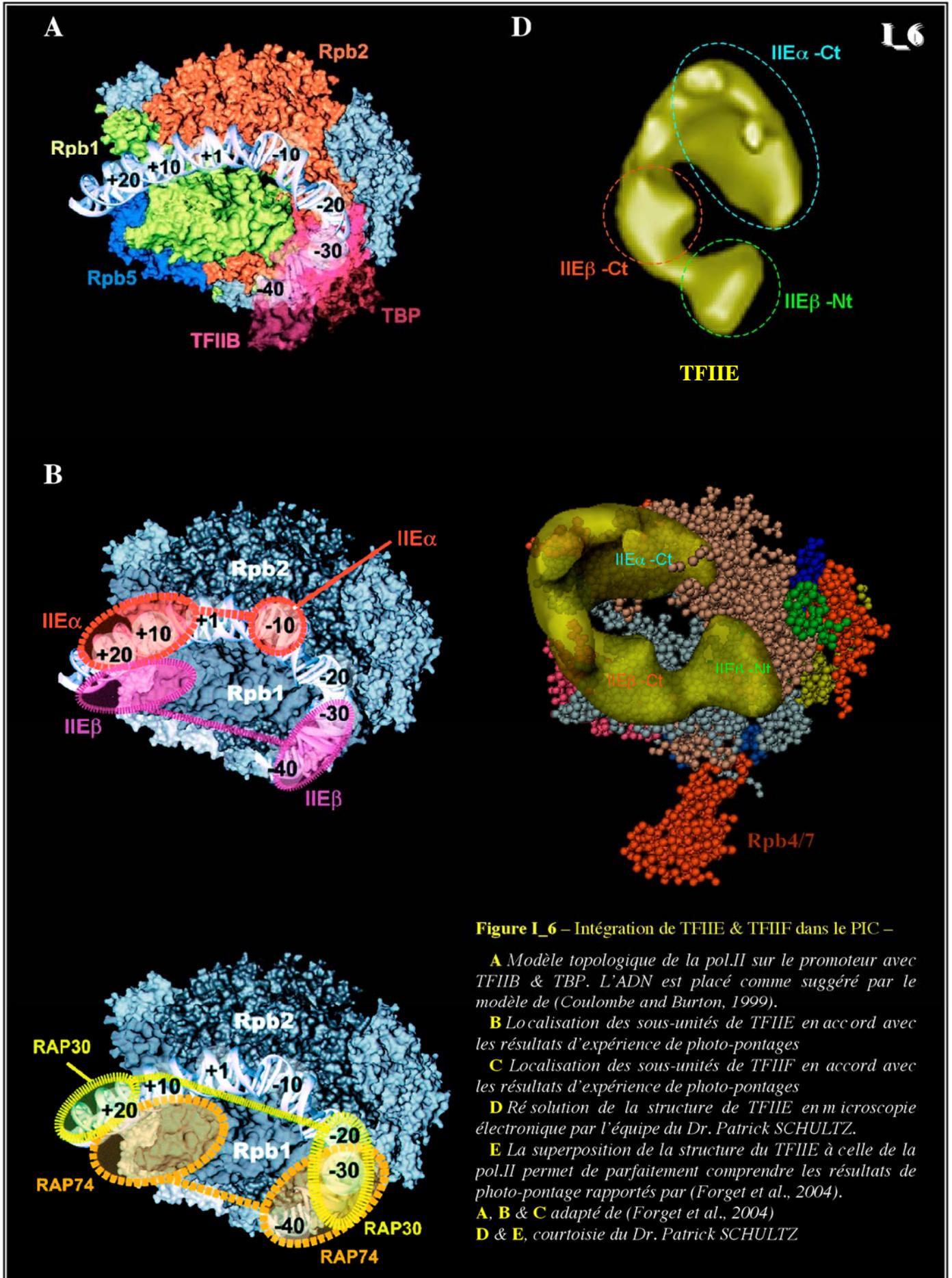


Figure I_6 – Intégration de TFIIIE & TFIIIF dans le PIC –

A Modèle topologique de la pol.II sur le promoteur avec TFIIIB & TBP. L'ADN est placé comme suggéré par le modèle de (Coulombe and Burton, 1999).

B Localisation des sous-unités de TFIIIE en accord avec les résultats d'expérience de photo-pontages

C Localisation des sous-unités de TFIIIF en accord avec les résultats d'expérience de photo-pontages

D Résolution de la structure de TFIIIE en microscopie électronique par l'équipe du Dr. Patrick SCHULTZ.

E La superposition de la structure du TFIIIE à celle de la pol.II permet de parfaitement comprendre les résultats de photo-pontage rapportés par (Forget et al., 2004).

A, B & C adapté de (Forget et al., 2004)

D & E, courtoisie du Dr. Patrick SCHULTZ

TFIIE β se subdivise en trois domaines. Un noyau N-terminal, qui adopte une structure tertiaire en « tête de fourchette » (forkhead ou winged-helix), capable de lier l'ADN en amont de l'élément TATA de manière aspécifique. Un domaine central basique avec un repliement hélice-boucle-hélice, qui interagit avec la pol.II et TFIIE α . Un domaine basique hélice-boucle C-Terminal qui s'associe avec les GTFs, TFIIB et RAP74 et qui reconnaît l'ADN simple brin. Ce domaine basique semblerait nécessaire à la pol.II pour passer de l'initiation à l'élongation de la transcription (Watanabe et al., 2003). TFIIE β interagit avec l'ADN en amont de l'élément TATA et en aval de l'Inr.

Le fait que TFIIE établisse des contacts avec l'ADN en amont et en aval de la boîte TATA et qu'il puisse interagir avec le centre actif de la Pol.II, à proximité du site d'initiation de la transcription, peut se concevoir dans un modèle où l'ADN s'enroulerait autour du PIC et où TFIIE aurait la forme d'un croissant (*cf. Fig.I_6 & 9*). Dans ce modèle, le noyau N-terminal de TFIIE β entrerait en contact avec l'ADN double brin de façon aspécifique en amont de la séquence TATA et sa partie C-terminale, qui interagit avec RAP74, se retrouverait en aval de l'Inr. L'élément TFIIE α se lierait à TFIIE β à ce niveau, interagirait avec l'ADN au même endroit et contacterait l'ADN, par son autre extrémité, en amont de l'Inr.

1.3.6 - TFIIH.

Le facteur général de transcription TFIIH est un complexe de masse moléculaire comparable à celle de la pol.II. TFIIH contient une dizaine de sous-unités qui s'organisent autour de deux complexes, le noyau et le complexe CAK (*cyclin-activating kinase complex*).

Le noyau contient l'hélicase 5'-3' XPB et les sous-unités GTF2H1(p62), GTF2H2(p44), GTF2H3(p34), GTF2H4(p52), ainsi que la protéine TFB5(p8) récemment identifiée et caractérisée (Ranish et al., 2004). Le complexe CAK comprend la cycline H, la kinase CDK7 et MAT1. Le complexe TFIIH comporte de plus l'hélicase 3'-5' XPD qui lie le noyau au CAK (*cf. Tbl.I_B*).

La structure tridimensionnelle de TFIIH à 38Å de résolution a été déterminée par microscopie électronique (Schultz et al., 2000). TFIIH se présente comme un anneau surmonté d'une excroissance renfermant cdk7 (*cf. Fig.I_7 ci-après*).

	H. sapiens	MM (KDa)	S. cerevisiae	Identité (%)	Caractéristiques
N o y a u	XPB	89	RAD25	49	Hélicase 5'-3'
	GTF2H1	62	TFB1	21	
	GTF2H2	44	SSL1	34	Zinc finger
	GTF2H3	34	TFB4	29	Ring finger
	GTF2H4	52	TFB2	34	Ancrage de XPB
	TFB5	8	TFB5	28	Stabilise le complexe
C A K	XPD	80	RAD3	51	Hélicase 3'-5'
	MAT1	32	TFB3	32	Ring finger
	CDK7	41	KIN28	42	phosphoryle le CTD
	Cycline H	38	CCL1	23	Cycline de CDK7

Tableau I_B – Les Sous-Unités de TFIIH –

Dans la première colonne figure la dénomination des sous-unités de TFIIH pour les H.sapien. Leurs masses moléculaires sont inscrites dans la seconde. La dénomination de leurs homologues chez la Levure, dans la troisième. Le taux identité entre ces homologues, dans la quatrième.

I 7

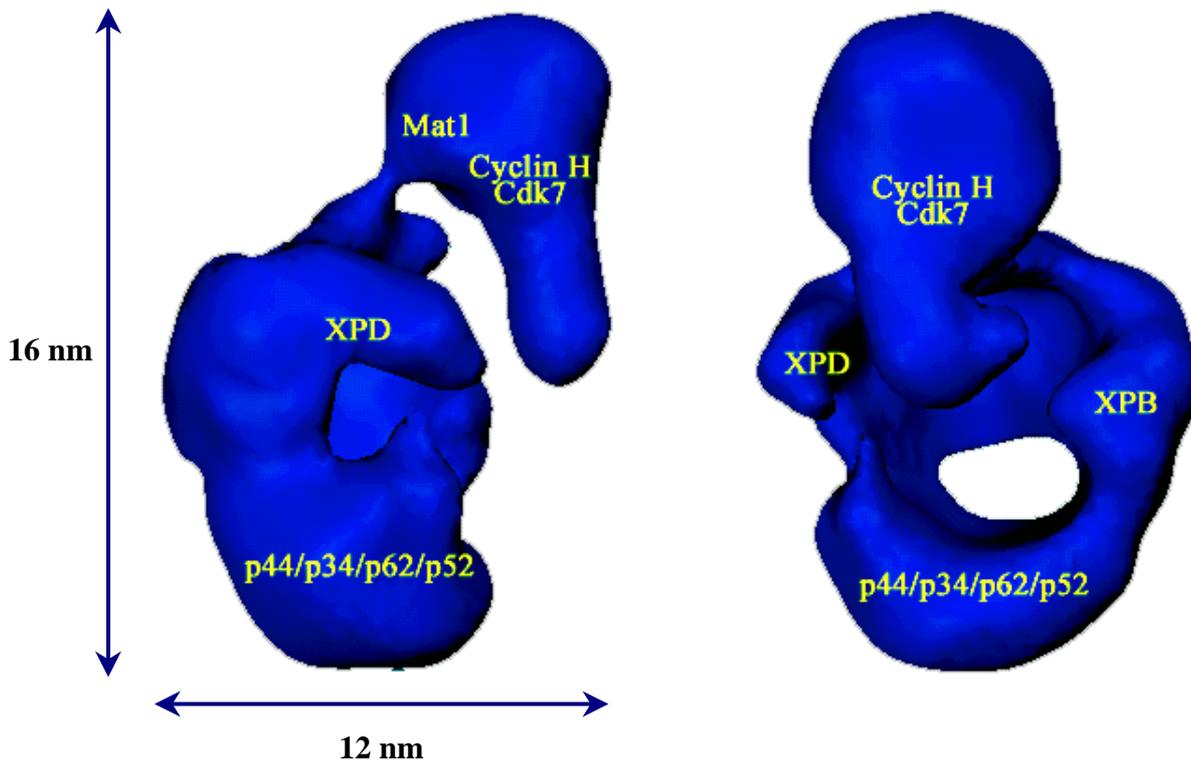


Figure I_7 - Structure Tridimensionnelle de TFIIH par Cryo-Electro-Microscopie -

Cette nouvelle structure de TFIIH est similaire à la précédente (Schultz et al., 2000) avec cette ouverture au centre qui pourrait laisser passer l'ADN. La localisation des différents composants du TFIIH est indiquée. Il est difficile d'améliorer la résolution de manière significative, Le facteur TFIIH étant de manière intrinsèque très flexible et ces conditions ne sont pas adaptées à une étude structurale par microscopie électronique. Avec l'aimable autorisation du Dr. Patrick SCHULTZ.

TFIIH intervient dans trois mécanismes vitaux pour la cellule : le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la transcription. Ces deux derniers mécanismes sont d'ailleurs finement liés grâce à TFIIH (Frit et al., 2002). Le complexe CAK, sous forme libre, intervient pendant la transition G2/M, XPD est capable de réguler l'activité de CAK et donc la mitose (Chen et al., 2003). TFIIH est impliqué dans le système de réparation par excision de nucléotides (*NER : Nucleotide Excision Repair*) en permettant la séparation des deux brins de l'ADN autour de la lésion. TFIIH est également nécessaire à la réparation des lésions oxydatives de l'ADN.

Lors de l'initiation de la transcription l'activité hélicase ATP-dépendante de TFIIH est nécessaire à l'ouverture de la double hélice d'ADN. Deux mécanismes ont été proposés pour décrire ce processus.

Le Pr. B. COULOMBE, et ses collaborateurs ont proposé que l'enroulement de l'ADN autour du PIC induit une courte zone de dénaturation de l'ADN, ceci à proximité du site d'initiation de la transcription. Cette zone constitue un site d'entrée pour l'hélicase XPD de TFIIH. Par la suite, XPD catalyse l'ouverture des deux brins de manière ATP-dépendante (Coulombe and Burton, 1999).

Dans le modèle exposé par le Dr. T.K. KIM, TFIIH établit des contacts exclusivement avec le promoteur, en aval de site d'initiation de la transcription (*cf. Fig.I_8*). La fonction de XPD différencierait alors des hélicases classiques : XPD écarterait les deux brins d'ADN autour du site d'initiation de la transcription en déroulant le duplex d'ADN en aval de ce site (Kim et al., 2000).

Après l'ouverture de la double hélice d'ADN, la sous-unité cdk7 de TFIIH phosphoryle la sérine 5 de l'heptapeptide répété du CTD de la Pol.II. Cette phosphorylation stimule la synthèse de la première liaison phosphodiester de l'ARN et permet à la Pol.II de se libérer des autres GTFs pour entrer en phase d'élongation.

TFIIH possède un rôle de régulateur de la transcription puisque la kinase 8 cycline-dépendante du médiateur module l'activité de cdk7 en phosphorylant la cycline H. Ce complexe interagit également avec de nombreux facteurs de transcription tel que l'antigène nucléaire n°2 du virus d'Epstein Barr (*EBNA2 : Epstein Barr Nuclear Antigen 2*), la protéine X du virus de l'hépatite B (*HBX : Hepatitis virus B X protein*) ou encore VP16 (Zurita and Merino, 2003).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de TFIIH dans la transcription par l'ARN polymérase I (*Pol.I*). Toutefois TFIIH ne semble pas être impliqué dans l'ouverture

de promoteur de classe I mais plutôt dans l'élongation (Hoogstraten et al., 2002; Iben et al., 2002).

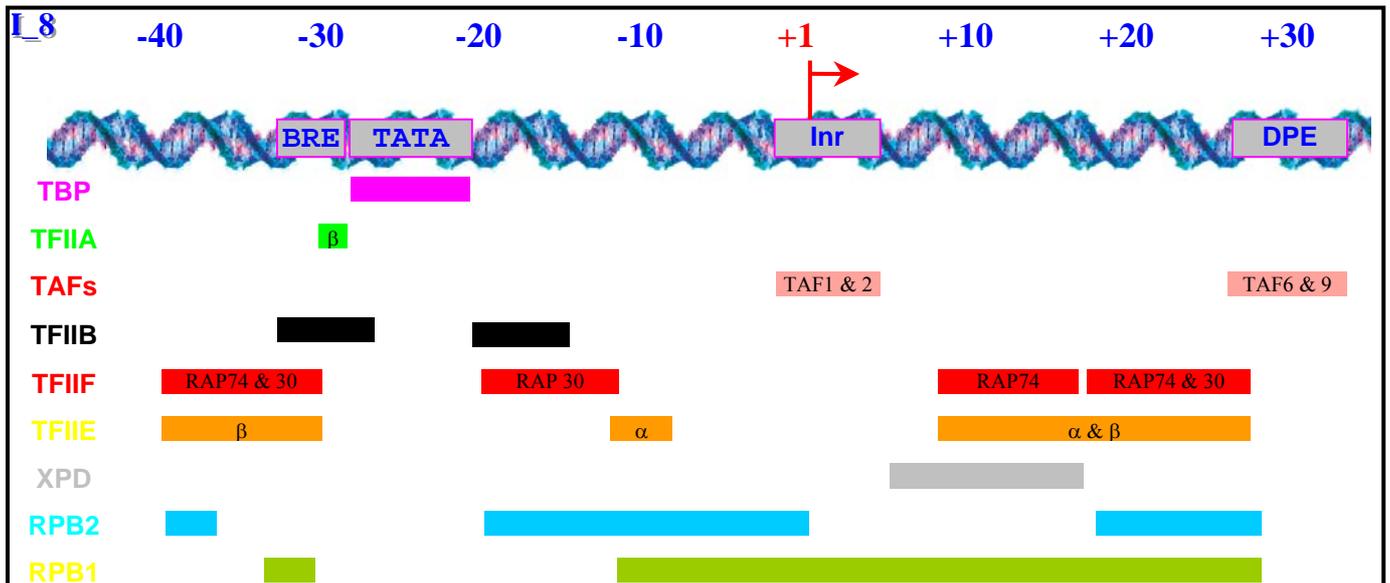


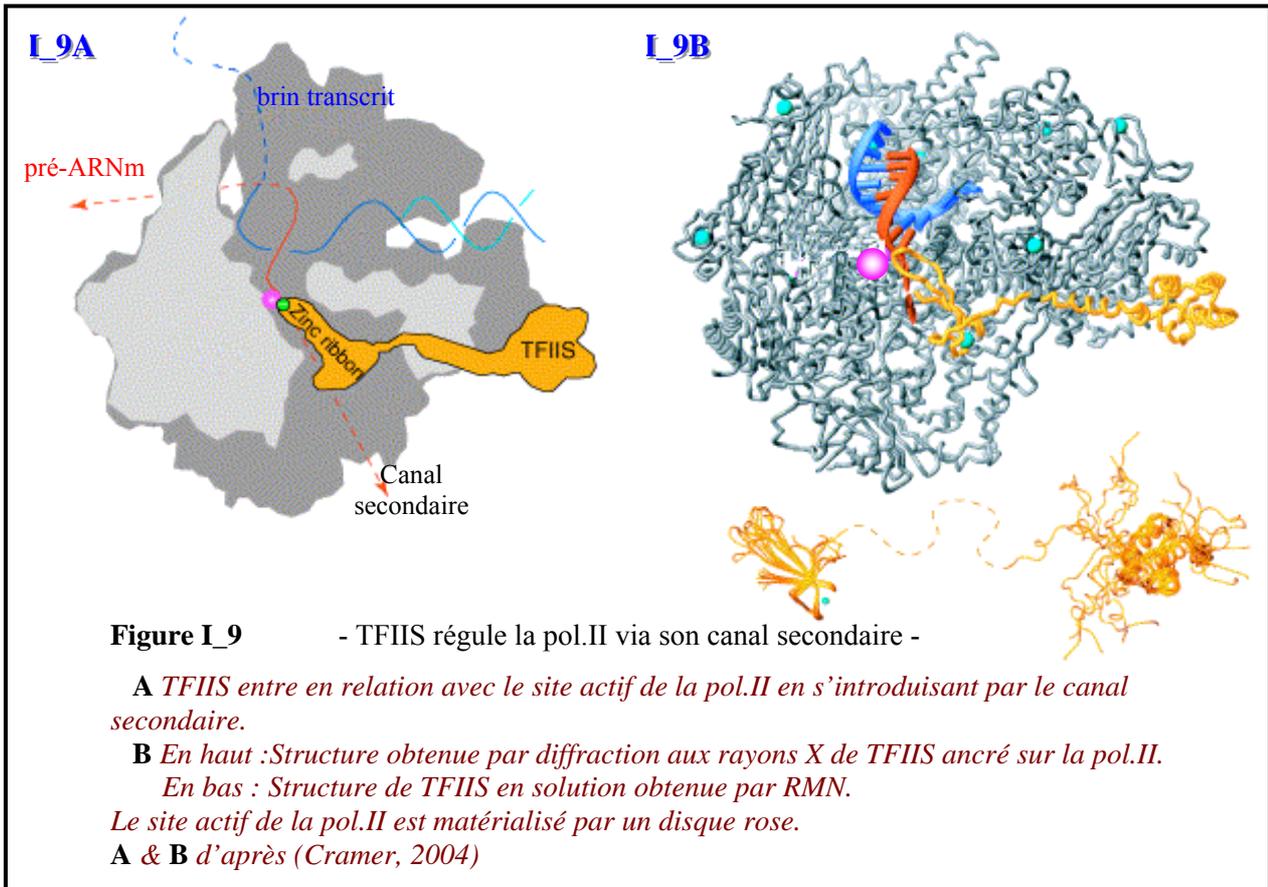
Figure I_8 – Localisation des Eléments qui Contactent le Promoteur –

Schéma indiquant les différents domaines du promoteur occupés lors de l'initiation de la transcription des gènes de classe II.

d'après les résultats publiés dans (Forget et al., 2004; Hahn, 2004; Shao et al., 2005)

1.3.7 – TFIIS.

TFIIS est un facteur monomérique d'élongation de la transcription qui favorise le clivage du pré-ARNm par la pol.II en fin d'élongation. La partie C-terminale de TFIIS après s'être introduite dans le canal secondaire de la pol.II (cf. §1.2.1-De la Structure à la Fonction et Fig.I_9) contacte le site actif de la pol.II pour le remodeler en site de clivage hydrolytique (Kettenberger et al., 2003). TFIIS ne fait pas partie du PIC et il n'est pas indispensable à l'initiation de la transcription. Il peut pourtant être sollicité lors de l'initiation de la transcription de certains gènes chez la levure. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatique ont ainsi montré un taux de TFIIS liés aux promoteurs de *GAL1*, *GAL2* & *GAL3* supérieur à celui observé dans des régions plus distales de ces gènes. La mobilisation rapide de TBP et de la pol.II sur les promoteurs de ces gènes après l'ajout de galactose dans les milieux nutritifs, est directement liée au recrutement de TFIIS sur ces promoteurs (Prather et al., 2005). Il semblerait que TFIIS soit recruté sur le promoteur par la sous unité MED31 du médiateur (cf. §1.3.9-Le Médiateur) et que ce recrutement soit une étape précoce de l'initiation de la transcription, étape prévenant d'éventuelles transcriptions abortives



(communication personnelle du Dr. Michel WERNER LPG/Laboratoire de Physiogénomique, CEA/Saclay, SBGM, Gif sur Yvette). Si TFIIIS intervient de manière ubiquitaire lors de l'élongation, son rôle pendant l'initiation de la transcription serait néanmoins plus spécifique puisque de nombreux gènes de Levure ne montrent pas d'enrichissement en TFIIIS sur leurs promoteurs.

1.3.8 - Le Médiateur.

La Pol.II et les GTFs sont suffisants pour la transcription de base dans un système reconstitué *in vitro*, cependant de tels systèmes ne peuvent répondre à l'activation de la transcription par des activateurs que dans des cas spécifiques. Il est apparu comme une évidence, au début des années 90, qu'un adaptateur est nécessaire pour faire la liaison entre les activateurs transcriptionnels et les GTFs. Cet adaptateur, appelé complexe médiateur, est conservé au cours de l'évolution et exprimé de manière ubiquitaire, de la Levure à l'Homme. Initialement découvert chez la Levure, le médiateur est incapable de lier directement l'ADN ; il est recruté par les activateurs de la transcription. Le complexe médiateur est connecté

directement par ces activateurs à la machinerie de transcription et stimule cette dernière ainsi que la phosphorylation du CTD de la Pol.II par TFIIF.

Le médiateur est composé de plus d'une vingtaine de sous-unités. Chez l'Homme deux principaux complexes médiateurs ont été isolés, un large de 2MDa nommé ARC-L (*Activator Recruited Cofactor-Large*) et un plus petit de 0,5MDa : CRSP (*cofactor required for Sp1 activation*). Des études biochimiques ont montré que ces complexes s'organisent autour de quatre domaines dont trois ont été observés par microscopie électronique. Chez la Levure, le médiateur adopte une structure en forme de croissant. La queue du médiateur est organisée autour de la protéine MED15 (yGal11). Le corps du médiateur est agencé autour des protéines MED9 (yCse2) et MED10 (yNut2). Le module constitué autour de la protéine MED17 (ySrb4) est la tête du médiateur. Le quatrième sous-complexe, contient, entre autre, les kinases Cdk8 et la cycline C. Ce module, très labile n'a pu être purifié avec l'ensemble du médiateur, lors d'observations en microscopie électronique. La forme de ces complexes varie toutefois en fonction de leurs partenaires d'interactions, activateurs ou Pol.II (Davis et al., 2002; Taatjes et al., 2002).

Le module MED15 est capable d'interagir avec une large gamme d'activateurs comme VP16, E1A ou GCN4, c'est pour cela qu'il est considéré comme le domaine majeur de reconnaissance des activateurs du médiateur. La délétion de ce domaine abolit en outre la capacité du médiateur à lier ces activateurs, sans pour autant altérer sa participation à la transcription basale. Le module MED9/10 reconnaît de nombreux récepteurs nucléaires, RAR α , RXR α , ER, AR, VDR, PPAR γ , TR, GR et interagit également avec TFIIF. Le module MED17 régule l'activité de l'ARN polymérase en agissant au niveau de son CTD non phosphorylé, puisque les protéines Srb ont initialement été décrites chez la Levure comme des suppresseurs dominant des effets dûs au raccourcissement du CTD. Il reconnaît aussi p53 et VP16. Le module MED17, ainsi que le module MED9/10, interagissent avec TBP et TFIIB (Lewis and Reinberg, 2003).

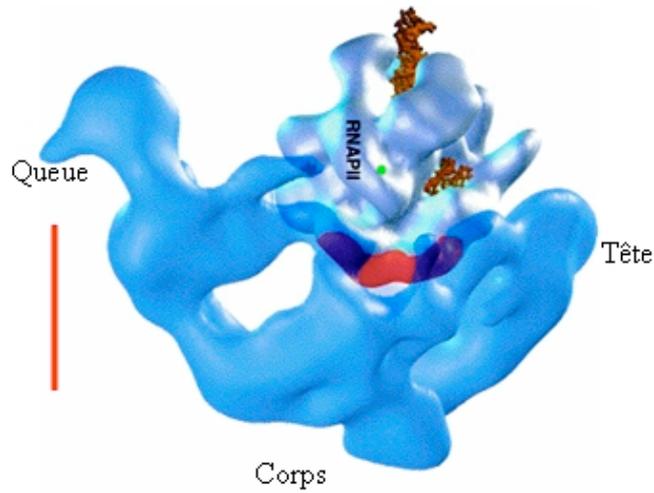
La composition des complexes médiateurs n'est pas clairement établie. Il existerait plusieurs complexes médiateurs, possédant des sous-unités communes, mais dont la composition varie en fonction du type cellulaire, des conditions de culture et de l'activateur par lequel il est recruté. Dans cette grande variété on retrouve néanmoins le classement des médiateurs en deux groupes, ceux de la taille du complexe CRSP tel que PC2 (*Positive Cofactor-2*); ceux d'une taille comparable à celle d'ARC-L, comme DRIP (*vitamin-D-Receptor Interacting Protein*) ou TRAP (*Thyroid-hormone Receptor Associated Protein*). On ne peut toutefois pas exclure que la diversité de procédure employée pour purifier les

complexes médiateurs et/ou la limitation de sensibilité des techniques utilisées pour la détection des protéines, soient à l'origine de cette pluralité. Les médiateurs ne seraient en fait, qu'un seul et même complexe possédant une composition modulable comme le montrent des analyses protéomiques récentes (Sato et al., 2004) lesquelles font appel à la technologie d'identification multidimensionnelle de protéines (*MudPIT*: *Multidimensional Protein Identification Technology* (cf. Fig.I_10 ; (Washburn et al., 2001)). Il a été ainsi découvert que le recrutement d'un médiateur associé à Cdk8 (ySrb10) réprime la transcription et que l'activation de cette transcription passe par le relargage du module Cdk8 par le médiateur (Mo et al., 2004). Ce module étant absent de CRSP et PC2, cela pourrait peut-être expliquer les observations *in vitro* du Dr. D.J. TAATJES, (Taatzjes et al., 2002) qui suggèrent que ARC-L est inerte alors que le petit complexe médiateur est actif sur le promoteur.

Le rôle du médiateur lors de l'initiation de la transcription n'a pas encore été clairement établi. Il est difficile de savoir si le médiateur et la Pol.II sont recrutés ensemble par le PIC avant l'initiation de la transcription ou si le médiateur est déjà en place quand la Pol.II entre dans le PIC ou encore si le recrutement du médiateur intervient après l'arrivée de la Pol.II. Des ChIPs de MED1 sur des promoteurs activés par les récepteurs aux oestrogènes ou aux hormones thyroïdiennes montrent que l'arrivée du médiateur précède de peu celle de la Pol.II (Shang et al., 2000; Sharma and Fondell, 2002). Au contraire, le même type d'expérience sur le promoteur α -antitrypsine d'entérocyte a montré que le médiateur et la Pol.II sont présents sur le promoteur bien avant l'initiation de la transcription (Soutoglou and Talianidis, 2002). Il a également été observé que le médiateur pouvait exister sous une forme associée à TFIID et TFIIA et que le recrutement de ce complexe DAMed sur un promoteur GAL4 par VP16 était nécessaire et suffisant pour recruter par la suite la Pol.II (Johnson and Carey, 2003). Une autre étude montre enfin que l'initiation de la transcription au niveau du gène hsp70 de *Drosophile* débute avec l'arrivée du médiateur, quand la Pol.II est déjà en place sur ce promoteur (Park et al., 2001).

En fait, la disparité entre ces nombreuses données reflète explicitement que le moment où le médiateur est impliqué dans l'initiation de la transcription est fonction du contexte dans lequel se trouve le promoteur.

I_10A



I_10B

S. cerevisiae	Nomenclature unifiée	2MDa				0,5MDa			MudPIT										
		rat MED	TRAP/SMCC	ARC	DRIP	mMED	PC2	CRSP	HeLa contrôle	293 contrôle	f-Cdk8 (HeLa)	f-MED8 (HeLa)	f-MED8 (293)	f-MED9 (HeLa)	f-MED10 (HeLa)	f-MED19 (HeLa)	f-MED26 (HeLa)	f-MED28 (HeLa)	f-MED29 (HeLa)
Srb10	Cdk8																		
	Cdk11																		
Srb11	Cycline C																		
	MED12L																		
Srb8	MED12																		
	MED13L																		
Srb9	MED13																		
Med6	MED6																		
Med8	MED8																		
Med11	MED11																		
Srb4	MED17																		
Srb5	MED18																		
Rox3	MED19																		
Srb2	MED20																		
Srb6	MED22																		
	MED28																		
	MED29																		
	MED30																		
Med1	MED1																		
Med4	MED4																		
Nut1	MED5																		
Med7	MED7																		
Cse2	MED9																		
Nut2	MED10																		
Srb7	MED21																		
Soh1	MED31																		
Med2	MED2																		
Pgd1/Hrs1	MED3																		
Rgr1	MED14																		
Gal11	MED15																		
Sin4	MED16																		
	MED23																		
	MED24																		
	MED25																		
	MED26																		
	MED27																		

Figure I_10 (ci-contre) – Le Médiateur, Structure & Composition –

A Reconstruction chez la Levure, par cryo-électro-microscopie, de l'holoenzyme : pol.II + médiateur avec une résolution de 35Å. Le CTD de Rpb1 est indispensable à la formation de cette structure. bar rouge : 100Å.

B Classiquement les médiateurs ont été subdivisés en deux groupe en fonction de leurs masses moléculaires. Dans la partie gauche du tableau figure la composition déterminée de manière biochimique du médiateur de Levure et de plusieurs autres complexes médiateurs de mammifères.

La nomenclature utilisée pour nommer les sous-unités du médiateur est présentée dans (Bourbon et al., 2004). Les sous-unités présentes dans les complexes sont représentées par un rectangle bleu, les absentes par un rectangle jaune.

La partie gauche du tableau montre les partenaires d'interaction de MED8, 9, 10, 19, 26, 28, 29 et Cdk8 dans les cellules HeLa ou HEK293 déterminés par MudPIT à partir de protéines portant une étiquette flag. Étonnamment, des protéines initialement décrites comme spécifiques d'un complexe médiateur comme MED19, 28 ou 29 ont été retrouvées dans des complexes contenant la majorité des protéines MED.

A adapté de (Chadick and Asturias, 2005)

B adapté de (Conaway et al., 2005)

1.4) L'Assemblage du Complexe de Pré-Initiation.

La pol.II, seule, n'est capable ni d'initier la transcription de façon spécifique, ni de modifier son activité en réponse aux protéines régulatrices : l'initiation de la transcription nécessite l'assemblage d'un complexe de pré-initiation (*PIC* : *PreInitiation Complex*), complexe d'environ 2MDa et contenant plus d'une trentaine de protéines. Il existe deux modèles d'assemblage du PIC : un modèle séquentiel, dans lequel l'arrivée d'un nouveau partenaire constitue une progression linéaire dans le processus allant de la reconnaissance du promoteur à la libération de la pol.II. Un autre modèle où le PIC est pré-assemblé en holoenzyme, c'est-à-dire contenant déjà certains GTFs et la pol.II avant toute reconnaissance du promoteur.

Dans le modèle d'assemblage séquentiel du PIC, les étapes qui conduisent à la transcription par la pol.II débutent par la liaison du complexe TFIID au promoteur. La sous-unité TBP du TFIID reconnaît spécifiquement la boîte TATA du promoteur ; la reconnaissance de certains éléments du promoteur par d'autre sous-unité du TFIID peut également être nécessaire à cette étape. Les interactions TFIID/ADN sont alors stabilisées par TFIIA et TFIIB. La plateforme D-A-B constitue une surface de reconnaissance pour la pol.II qui, associée avec TFIIF, entre dans le PIC sous sa forme hypophosphorylée. La formation du PIC s'achève par le recrutement des facteurs TFIIIE et TFIIH. L'action combinée de TFIIIE, de TFIIF et de l'hélicase XPB au sein de TFIIH provoque l'ouverture du duplexe d'ADN autour du site d'initiation. L'activité hélicase de XPB ne s'emblerait pas impliquée dans cette ouverture. Ce serait l'activité ATPasique de XPB qui grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse

de l'ATP, induirait ici une réorganisation allostérique du PIC engendrant ainsi la séparation des deux brins d'ADN (Lin et al., 2005).

Comme alternative au modèle d'assemblage séquentiel, il existe le modèle de l'holoenzyme. Décrit pour la première fois en 1994, ce complexe pré-assemblé contient la pol.II, TFIIB, TFIIF, TFIIH et également des protéines appelé Srb (Koleske and Young, 1994). Plusieurs holoenzymes ont été depuis caractérisées, comprenant par exemple, Gal11, certains cofacteurs positifs et négatifs ou encore le facteur de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Cette diversité peut-être expliquée par des conditions de purifications différentes. L'absence de TFIID est pourtant une caractéristique commune à toutes ces préparations de l'holoenzyme. Même dans le modèle du complexe pré-assemblé, deux étapes sont ainsi nécessaires pour initier la transcription : d'abord le recrutement de TFIID sur le promoteur puis, l'arrivée de l'holoenzyme (Ranish et al., 1999).

Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces modèles sont basés sur des observations expérimentales réalisées avec des « promoteurs classiques » contenant une boîte TATA et un Inr, ce qui n'est pas le cas de la majorité des régions promotrices. Il a été montré dans les cellules HeLa que, si un TFIID comportant une TBP muté, défectif dans sa liaison à l'ADN, était incapable d'initier la transcription à partir du promoteur à boîte TATA de la β -polymérase, ce même TFIID était tout à fait apte d'initier la transcription à partir du promoteur dépourvu d'élément TATA du gène de la terminale désoxynucléoyidyl-transférase (TdT) (Martinez et al., 1995). De même des expériences d'immunoprécipitation de protéines liées de façon covalente à la chromatine ont montrées que la pol.II est recruté sur promoteur du gène l'interféron β (*IFN- β*) avant l'arrivée de TBP (Lomvardas and Thanos, 2002). Ces résultats mettent en évidence que le mécanisme de formation du PIC peut-être différent selon les promoteurs. Le séquençage du génome humain a, de plus, montré l'existence de plusieurs paralogues de TBP, de TAFs et de TFIIA, ce qui souligne l'aspect modulaire du PIC.

1.5) La Ré-Initiation de la Transcription.

Dans les systèmes de Levure, il a pu être mis en évidence que l'étape d'échappée du promoteur aboutit à un complexe d'échafaudage de ré-initiation (Scaffold complex), qui contient tous les composants du PIC à l'exception de la pol.II, TFIIB, et TFIIF (Yudkovsky et al., 2000). Ce complexe sert de plateforme pour le recrutement de la pol.II et des GTFs

manquants pour de multiples cycles de transcription. Le niveau de transcription d'un gène dépend en effet, de l'initiation mais aussi de la ré-initiation. Pour certains promoteur, *in vivo*, le taux de ré-initiation est même quatre fois supérieur au taux d'initiation (Jiang and Gralla, 1993).

Le complexe d'échafaudage de Levure contient TFIID, TFIIA, TFIIH, TFIIIE et le médiateur ce qui signifie que ce complexe recrute une forme libre de la pol.II, forme incompatible avec l'environnement de la pol.II trouvée dans l'holoenzyme. La formation de ce complexe est dépendante de l'ATP et de TFIIH, néanmoins l'activité enzymatique de TFIIH impliquée n'a pas pu être mise en évidence. A l'image de ce qui se produit lors de l'ouverture de l'ADN lors d'une initiation *de novo*, l'hydrolyse de l'ATP fournit peut-être l'énergie nécessaire à une réorganisation structurale de l'échafaudage pour accéder à la ré-initiation.

Il a été montré que des activateurs de transcription peuvent réguler l'efficacité de la ré-initiation en stabilisant l'échafaudage de ré-initiation ou en favorisant le recrutement des composants manquants (Yudkovsky et al., 2000).

II

TFIID & les
FACTEURS ASSOCIES
à TBP.

II TFIID & les FACTEURS ASSOCIES à TBP

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la première étape de formation du PIC est la reconnaissance du promoteur par le complexe TFIID. Ce facteur est le seul GTF à se lier spécifiquement à l'ADN.

2.1) La Composition du TFIID

La composition de TFIID ainsi que les séquences peptidiques de TBP et des TAFs sont fortement conservés au cours de l'évolution. Devant la multitude de paralogues et d'orthologues des TAFs existants et pour éviter toute confusion entre ces sous-unités de masses moléculaires variées, une nouvelle nomenclature a été adoptée par la majorité des laboratoires travaillant sur le sujet (Tora, 2002).

Dans cette nouvelle nomenclature les TAFs ne sont plus nommés en fonction de leur masse moléculaire mais de 1 à 15. Chaque orthologue porte le même chiffre, les paralogues sont agrémentés du suffixe « b » ; les protéines apparentées aux TAFs coexistant dans le même organisme mais dont l'interaction avec TBP n'a pu être mise en évidence sont appelés « TAF-Like » (*cf. Tbl.II_A*). Toutefois, TAF2Q, paralogue de TAF7 exprimé spécifiquement dans les gonades est encore appelé TAF7L et non TAF7b du fait que son interaction spécifique avec TBP n'a été décrite qu'après la mise en place de la nouvelle nomenclature (Pointud et al., 2003).

2.2) La Structure du TFIID

Le motif de repliement de type histone (*HFD : Histone Fold Domain*) est présent dans plusieurs TAFs et joue un rôle important dans la structure de TFIID. Les histones sont des protéines basiques qui s'associent à l'ADN pour former des nucléosomes. Ceux-ci vont permettre un premier niveau de condensation de la chromatine. Les histones H2A, H2B, H3,

	Homo sapien	Drosophila melanogaster	Saccharomyces cerevisiae	
TAF1	hTAF _{II} 250	dTAF _{II} 230	yTAF _{II} 145	
			Bdf1/Bdf2	
TAF2	hTAF _{II} 150	dTAF _{II} 150	yTAF _{II} 150	
TAF4	hTAF _{II} 135	dTAF _{II} 110	yTAF _{II} 48	HFD
TAF12	hTAF _{II} 20	dTAF _{II} 30a	yTAF _{II} 68	HFD
TAF5	hTAF _{II} 100	dTAF _{II} 80	yTAF _{II} 90	
TAF6	hTAF _{II} 80	dTAF _{II} 60	yTAF _{II} 60	HFD
TAF9	hTAF _{II} 31	dTAF _{II} 40	yTAF _{II} 17	HFD
TAF7	hTAF _{II} 55	(AAF54062)	yTAF _{II} 67	
TAF3	hTAF _{II} 140	dTAF _{II} 155	yTAF _{II} 47	HFD
TAF10	hTAF _{II} 30	dTAF _{II} 24	yTAF _{II} 25	HFD
		dTAF _{II} 16		HFD
TAF8	hTaube nuss	dProdos	yTAF _{II} 65	HFD
TAF14	(ENL/AF9)	N.C.	yTAF _{II} 30	
TAF11	hTAF _{II} 28	dTAF _{II} 30β	yTAF _{II} 40	HFD
TAF13	hTAF _{II} 18	(AAF53875)	yTAF _{II} 19	HFD
TAF15	hTAF _{II} 68	N.C.	N.C.	

Tableau II_A

- La Nomenclature des TAFs -

Correspondance entre la nouvelle nomenclature des TAFs et leur ancienne classifications chez l'Homme (h), la Drosophile (d) et chez la Levure (y). Les TAFs spécifiques au TFIID sont écrits en noir, ceux également présents dans TFTC sont inscrits en rouge et bleu, ceux partagés par TFIID, TFTC, SAGA et PCAF en bleu. La présence d'un motif de repliement de type histone est indiquée par « HFD ».

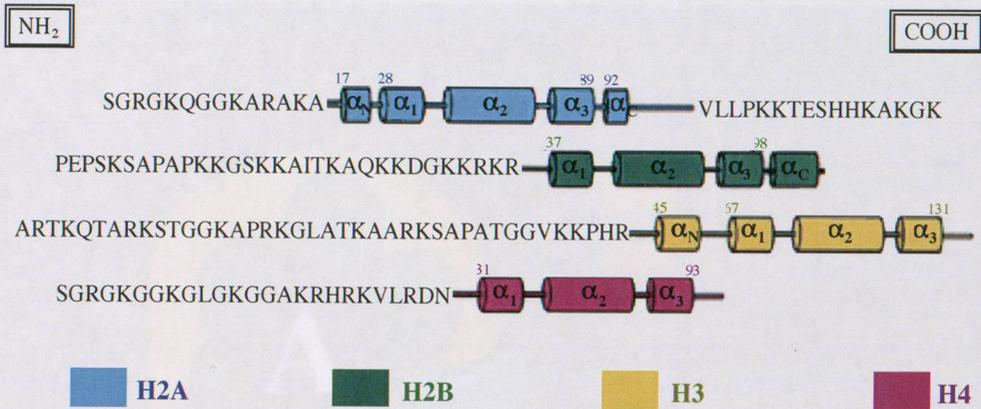
H4 du nucléosome s'organisent en hétérodimères (H2A/H2B) et (H3/H4). Un hétérotétramère (H3/H4)₂ et deux hétérodimères (H2A/H2B) s'arrangent en octamère compact [2(H2A/H2B)•(H3/H4)₂]. Ces interactions se font principalement grâce au domaine structural commun entre les quatre histones qu'est le HFD. Le HFD se compose d'une large

hélice α amphipathique (α_2), flanquée de boucles qui connectent cette hélice centrale à une autre hélice α (α_1-L_1 ; $L_3-\alpha_3$). Une hélice supplémentaire peut également être trouvée en C- ou N-terminal suivant la protéine. Les analyses de séquences peptidiques des différents TAFs et des d'interactions physiques dans le système double-hybride chez la Levure, de même que des co-expressions dans E.coli, ont montré que le domaine HFD est fréquemment rencontré dans ces protéines. Sur 14 TAFs, 9 possèdent ainsi ce motif conservé au cours de l'évolution (*cf. Tbl.II_A*). Certains HFDs des TAFs sont similaires aux séquences des HFDs d'histones. C'est le cas de TAF9, TAF6, TAF4 et TAF12 homologues de H3, H4, H2A & H2B respectivement. Les structures des l'hétérodimères hTAF(11/13) (Birck et al., 1998), hTAF(4/12) (Werten et al., 2002) et de l'hétérotétramère dTAF(6/9)₂ (Xie et al., 1996) confirment cette similarité (*cf. Fig.II_1*). Il a aussi été démontré que TAF3, TAF8 et TAF10 possèdent des HFDs. Le TAF10 joue un rôle-clef dans TFIID, en formant des hétérodimères avec TAF3 et TAF8.

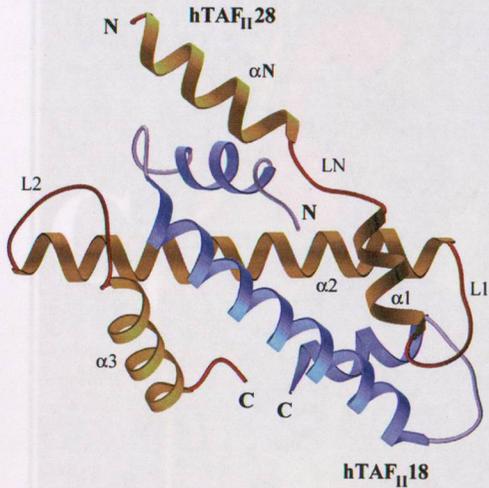
Du fait de l'hétérogénéité du TFIID et du nombre élevé de sous-unités que le compose, la structure atomique de ce GTF n'a pu être déterminée ni par RMN, ni par diffraction aux rayons X. Malgré tout, une structure tridimensionnelle du TFIID humain a pu être réalisée grâce à la superposition de plusieurs milliers d'images prises par microscopie électronique sous différents angles (Brand et al., 1999). A 35Å de résolution, TFIID, apparaît comme un agencement de trois lobes qui délimitent une large échancrure accessible au solvant dans laquelle l'ADN pourrait s'engager. Des expériences d'immunomarquage ont permis de localiser TBP et certains TAFs dont des TAFs à HFD dans ces trois lobes (Leurent et al., 2002; Leurent et al., 2004). TBP se situe à la base de l'échancrure entre le lobe C₁ et A alors qu'un dimère (TAF5)₂ servirait de charpente à l'ensemble du complexe. (*cf. Fig.II_2*).

L'existence de TAFs à HFD homologues aux protéines histones permettait d'envisager la présence d'une structure de type octamère de TAFs au sein du TFIID et laissait présager un hypothétique enroulement de l'ADN génomique autour du TFIID (Hoffmann et al., 1996). A la lumière des données collectées par l'équipe du Dr. Patrick SCHULTZ, de telles substructures dans les lobes du TFIID semblent peu probables. Premièrement, parce que le volume de chaque lobe est bien inférieur à celui d'un octamère de TAF et deuxièmement, parce que les TAFs nécessaires à la formation des octamères [(TAF4/TAF12)₂•(TAF6/TAF9)₂] et [(TAF3/TAF10)₂•(TAF11/TAF13)₂] ne coexistent pas en stoechiométrie suffisante dans chaque lobe.

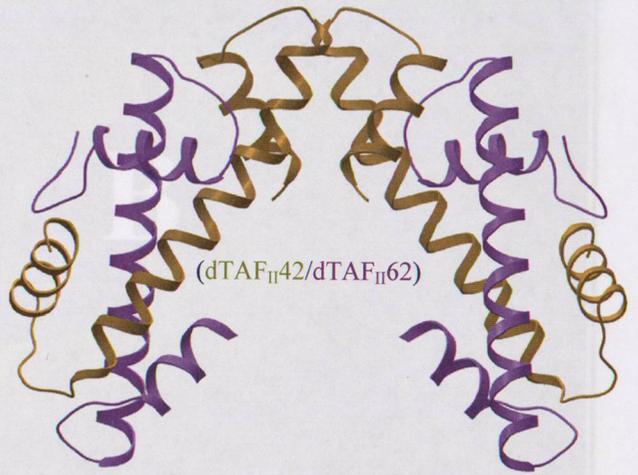
II_1A



II_1B



II_1C



II_1D

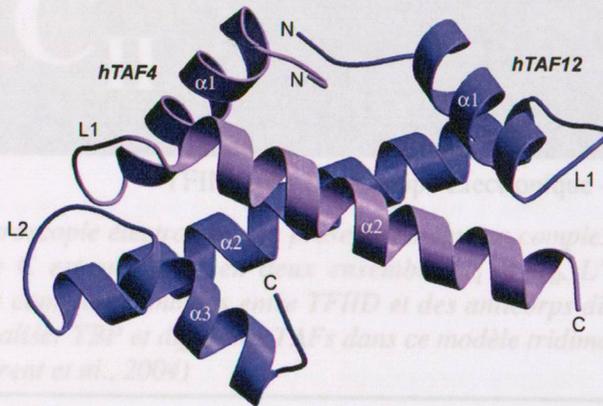


Figure II_1

- Le Repliement du Type Histone dans les TAFs -

A Structure secondaire des 4 protéines du core histone humain. Le motif HFD se divise en deux motifs hélice boucle hélice similaires et contigus résultant de la duplication d'un gène ancestral unique.

B Les *hTAF_{II}11* en bleu et *hTAF_{II}13* en jaune (*hTAF_{II}18* et 28) adoptent un repliement de type histone caractéristique de « tête à queue » similaire à celui de H4 et H3 (l'hélice α_N de *hTAF_{II}11* a été clivée lors du processus de cristallisation).

C Structure cristallographique de l'hétérotétramère (*dTAF_{II}9*/*dTAF_{II}6*)₂ (*dTAF_{II}42*/*dTAF_{II}62*)₂, (l'hélice α_N du *dTAF_{II}9* est absente de la représentation). Cette structure est comparable à l'hétérotétramère (H3/H4)₂ trouvé dans le nucléosome.

D Structure de cristallographique de l'hétérodimère *hTAF_{II}12*/*hTAF_{II}4*, (*hTAF_{II}20*/*hTAF_{II}135*) l'hélice α_3 du *hTAF_{II}4* est séparé de l'hélice α_2 par une très boucle et est donc absente du cristal.

B D'après (Birck et al., 1998), **C** d'après (Xie et al., 1996), **D** d'après (Werten et al., 2002)

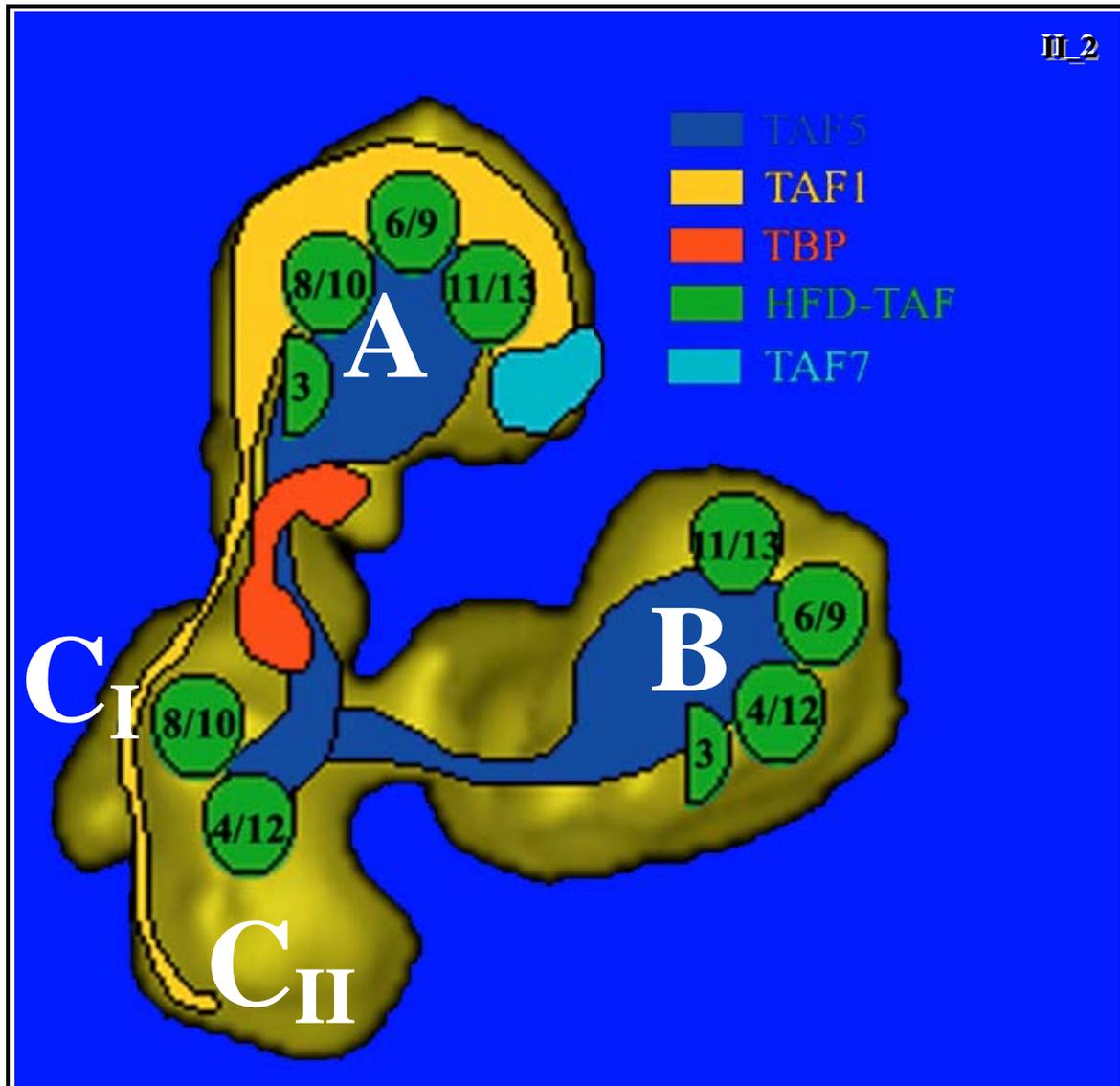


Figure II_2 – TFIID sous Microscope Electronique –

TFIID en microscopie électronique se présente comme un complexe avec trois lobes : A, B et C. Le lobe C est subdivisé en deux ensembles C_I et C_{II}. L'observation au microscope électronique de complexes immuns entre TFIID et des anticorps dirigés contre ses composants a permis de localiser TBP et différents TAFs dans ce modèle tridimensionnel de TFIID. Adapté de (Leurent et al., 2004)

2.3) A TAFs Vaillants Rien d'Impossible.

L'interprétation des résultats expérimentaux impliquant des TAFs est compliquée par le fait qu'un sous ensemble de TAFs participe à d'autres complexes ne contenant pas TBP. Le facteur TFTC (*TBP-Free-TAF_{II}S-Complex*), les complexes pCAF et STAGA (*SPT3-TAF9-GCN5 Acetylase*) chez l'Homme ou SAGA (*SPT ADA GCN5 Acetyltransferase*) chez la

Levure peuvent être cités comme exemples. Il est alors difficile de définir si, dans les expériences de mutations d'un TAFs, le phénotype observé résulte d'un défaut de l'activité du TFIID, d'une absence des complexes sans TBP, ou des deux. Néanmoins, dans de ce chapitre, les résultats présentés, le seront toujours dans l'optique d'une implication du TFIID.

2.3.1 - La Reconnaissance du Promoteur Minimal.

Le facteur, TFIID, une fois lié au promoteur, va diriger la construction du PIC. Cette liaison au promoteur passe par la reconnaissance de l'élément TATA par TBP mais également par certains TAFs capables d'interagir avec l'ADN. L'empreinte du TFIID fixé de manière covalente au promoteur, après digestion à la DNase I est en effet beaucoup plus étendue que l'empreinte générée par le seul TBP sur le promoteur (Burley and Roeder, 1996).

Le complexe formé par les TAF1 et 2 est capable de reconnaître spécifiquement l'Inr (Chalkley and Verrijzer, 1999). Le complexe trimérique TBP/TAF1/TAF2 est quant à lui suffisant pour initier la transcription au niveau de l'Inr des promoteurs TATA-dépendants (Verrijzer et al., 1995). La liaison TAFs/Inr est plus faible que la liaison TBP/TATA mais ces associations ont des effets transcriptionnels comparables.

L'hétérodimère TAF6/TAF9 est capable de reconnaître le DPE. Chacun de ces TAFs est capable de lier l'ADN mais leur hétérodimérisation améliore significativement cette liaison. Les HFDs de ces TAFs ne sont pas impliqués dans la reconnaissance du DPE, car, même si ce dimère est homologue à H4/H3, les résidus impliqués dans les contacts histones/ADN ne sont que peu conservés au sein de TAF6/TAF9. Ainsi, ce serait plutôt les régions conservées en C-terminal des HFDs de TAF6 et 9 qui permettraient la fixation de l'ADN (Shao et al., 2005).

L'hétérodimère TAF4/TAF12 est également capable de lier l'ADN, TAF4 seule établirait des contacts avec l'ADN et la présence de TAF12 stabiliserait ces derniers (Shao et al., 2005). La région de TAF4 responsable de ces interactions se situerait juste en N-terminal de la région conservée C-terminale de TAF4 (*CCTD* : *Conserved C-terminal Domain*). Le CCTD c'est révélé être l'hélice $\alpha 3$ du HFD de TAF4 (Thuault et al., 2002). TAF4 possède en effet une longue boucle de plus d'une centaine d'acides aminés entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de son HFD, qui pourrait relayer de multiples interactions protéine/protéine et interagirait avec l'ADN.

2.3.2 - Les TAFs sont des Coactivateurs Transcriptionnels.

A l'image du médiateur (*cf. §1.8 Le Médiateur*) ou des complexes de remodelage de la chromatine, les TAFs sont nécessaires, dans certains cas, pour activer la transcription dans des systèmes *in vitro*. Le facteur TBP seul ne peut initier par exemple la transcription en réponse aux activateurs dans des systèmes reconstitués. De nombreuses interactions *in vitro* entre des TAFs et des activateurs transcriptionnels ont été mises en évidence à ce jour (Burley and Roeder, 1996; Sauer and Tjian, 1997). La fonction de l'activateur Sp1 est notamment liée à son interaction avec dTAF4, comme l'a montré l'étude de mutations dans le domaine d'activation de Sp1, ou des expériences avec du TFIID partiellement reconstitué (Gill et al., 1994). Les TAFs peuvent également influencer négativement la transcription des gènes puisque TAF1 inhibe la liaison de TBP à l'ADN (Liu et al., 1998) (*cf. §3.5 Cartographie des Sites de Liaison de TBP*) et parce que la suppression de TAF4 augmente l'activation de la transcription par certains récepteurs nucléaires tels que RAR, TR et VDR dans les cellules de mammifères (Mengus et al., 1997). Les fibroblastes murins *taf4^{-/-}* présentent enfin une prolifération accrue, dûe à une activation de la voie de transduction du TGFβ (Mengus et al., 2005).

2.3.3 - Les TAFs dans le Cycle Cellulaire.

Les TAFs sont aussi impliqués dans la progression du cycle cellulaire. La majorité des inactivations des gènes codant les TAFs de Levure est létale. L'utilisation de mutants thermosensibles a néanmoins permis d'étudier les conséquences de ces mutations sur l'activation de la transcription. Des mutations dans yTAF1 conduisent à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ (Walker et al., 1997), alors que des mutations dans yTAF2, yTAF5 & yTAF12 conduisent à des arrêts du cycle cellulaire en phase G₂ (Apone et al., 1996; Reese and Green, 2001). Grâce à des puces à ADN, l'analyse de l'expression globale du génome de Levure a permis d'identifier les gènes dont l'expression est affectée par de telles mutations des TAFs. Parmi ces gènes, on retrouve plusieurs des cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, l'inactivation du gène codant pour TAF10 dans les cellules murines F9 où l'inactivation de TAF9 dans des cellules de poulet entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G₁/G₀ et induit l'apoptose (Chen and Manley, 2000; Metzger et al.,

1999). La surexpression de TAF4 réduit au contraire l'apoptose des cellules F9 (Perletti et al., 2001). L'inactivation de TAF4 dans les fibroblastes murins entraîne l'activation de gènes qui contrôlent le cycle cellulaire comme TGF β 1, TGF β 3 ou CTGF. Dans ces cellules *taf4*^{-/-}, TFIID est toujours présent et TAF4b, le paralogue de TAF4, y est intégré. Cela qui suggère que l'équilibre entre TAF4 & TAF4b au sein de TFIID régule le cycle cellulaire en contrôlant l'expression spécifique de certains gènes (Mengus et al., 2005).

Les TAFs peuvent contribuer plus directement au processus d'apoptose. L'isoforme δ de hTAF6 fait partie d'un complexe spécifique nommé TFIID π , dépourvu de hTAF9. L'expression de hTAF6 δ est augmentée dans les cellules suite à des *stimuli* apoptotiques, ce qui suggère l'implication de TFIID π dans des voies apoptotiques. L'induction de l'expression de hTAF6 δ n'a toutefois pas encore pu être posée comme cause ou conséquence de la mort cellulaire programmée.

2.3.4 - Les Activités Enzymatiques du TFIID.

TFIID possède une fonction histone acétyl transférase (*HAT*), des activités kinases et une activité de conjugaison et d'activation de l'ubiquitine (*UBAC : ubiquitin activating and conjugating*) ainsi que deux bromodomaines. L'ensemble de ces propriétés est porté par le TAF de masse moléculaire le plus élevé : TAF1 (hTAF_{II}250).

In vitro, TAF1 est capable d'acétyler la queue des histones H3 et H4 sous forme libre (Mizzen et al., 1996) ainsi que TFIIE β et TFIIF (Imhof et al., 1997). Les cellules ts13 de Hamster présentent une thermosensibilité due à une mutation dans le domaine HAT de TAF1. La prolifération de ces cellules est normale à 33°C mais, à la température non permissive de 39,5°C, un groupe spécifique de gènes est affecté ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G1/S et enclenche le processus d'apoptose (O'Brien and Tjian, 2000).

TAF1 possède également deux fonctions sérine/thréonine protéine kinase indépendantes l'une de l'autre : l'une, au niveau de la partie amino-terminale de la protéine (NTK), l'autre, dans de la partie carboxy-terminale (CTK). Chez la Levure, ces fonctions ainsi que les bromodomaines, sont portés non par γ TAF1 mais par Bdf1 (BromoDomain Factor 1), protéine associée à γ TAF1 dans γ TFIID. De la sorte, les fonctions portées par une seule protéine TAF1 chez les métazoaires sont portées par plusieurs protéines dans la Levure. *In vitro*, TAF1 peut s'autophosphoryler et phosphoryler la sous-unités RAP74 de TFIIF et TFIIA. *In vivo* ces fonctions kinases sont également importantes puisque la délétion du CTK

est létale pour la Drosophile (Wassarman and Sauer, 2001) De même TAF1 muté dans le NTK, mais avec un domaine HAT intègre, est incapable de secourir le phénotype thermosensible des cellules ts13 de hamster. Dans ces cellules 6% des gènes seraient d'ailleurs affectés par la perte de la fonction NTK (O'Brien and Tjian, 1998).

La troisième fonction enzymatique portée par TAF1 est une activité de conjugaison et d'activation de l'ubiquitine dirigée contre l'histone H1 (Pham and Sauer, 2000). TAF1 ne possède pourtant pas d'activité ubiquitine ligase apte à générer une chaîne poly-ubiquitine sur la protéine cible. La signification de cette mono-ubiquitination de H1 reste encore à découvrir.

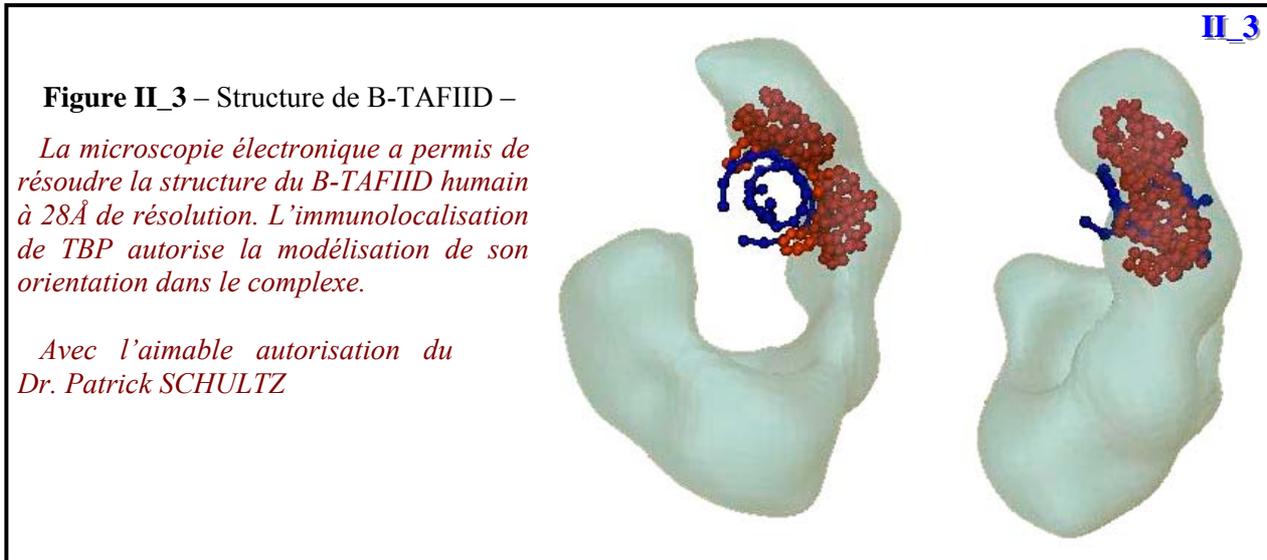
Il a été proposé que grâce aux bromodomains de TAF1, TFIID reconnaît spécifiquement les promoteurs des gènes qui doivent être transcrits. Une fois fixé sur le promoteur, TAF1 peut ensuite agir, soit sur la chromatine, soit sur d'autres facteurs grâce à ses activités HAT, UBAC et kinase.

2.4) B-TFIID, l'ambivalent.

TBP peut également influencer l'initiation de la transcription des gènes de classe II en s'associant avec un TAF qui ne fait pas partie du TFIID. Ce TAF de 170kDa, appelé B-TAF1 forme avec TBP le complexe B-TFIID (*cf. Fig. II_3*). B-TAF1, encore appelé Mot1p chez la Levure (*Mot1p : Modifier Of Transcription 1 protein*), appartient à la famille des ATPases SNF2. Que ce soit chez la levure (Poon et al., 1994) ou dans les cellules HeLa (Timmers et al., 1992), la majorité du TBP cellulaire est complexé à B-TAF1 et non à TFIID. L'association B-TAF1/TBP est forte puisque sa constante de dissociation (K_D) chez la Levure est de 1nM, c'est à dire du même ordre de grandeur de celle de γ TBP pour l'élément TATA, ($K_D \approx 4,5nM$, (Gumbs et al., 2003)).

B-TFIID a été initialement décrit comme un répresseur non spécifique de la transcription du fait que l'inactivation de *MOT1* augmente la transcription à partir des promoteurs minimaux. B-TAF1 est de plus en compétition directe avec TFIIA pour interagir avec TBP, ($K_D(TFIIA/TBP) \approx 10nM$) car tous les deux établissent d'importants contacts avec l'hélice α H2 de TBP (*cf. §III.5 Cartographie des Sites d'Interaction de TBP*). Il a donc été proposé un modèle où un élément B-TAF1 utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour dissocier TBP de l'ADN et ainsi constituer un B-TFIID inerte en transcription. Le complexe B-TAF1/TBP/ADN est d'ailleurs incapable de se dissocier sans ATP (Auble and Hahn, 1993). Le K_D du complexe B-TFIID/ADN est également de l'ordre du nanomolaire, ce

qui signifie que ce complexe est très stable. En absence d'ATP sa demi-vie est d'environ 12min ; en présence d'ATP cette construction ce désassemble rapidement (Gumbs et al., 2003).



Les données qui suivirent, montrèrent que quand la concentration de B-TFIID est faible, ce facteur active la transcription de base (Muldrow et al., 1999). Il est même nécessaire à la transcription à partir de promoteurs faibles ne possédant pas de boîte TATA canonique (Geisberg et al., 2002). Des analyses de ChIP ont montré que le recrutement de yB-TAF1 sur le promoteur du gène du transporteur HXT2 de glucose coïncide avec l'arrivée de yTBP dans un environnement pauvre en glucose. L'association de yB-TAF1 au promoteur n'est que transitoire et précède celui de la pol.II, alors que celle de yTBP perdure (Andrau et al., 2002). B-TFIID ne serait donc pas un inhibiteur de la transcription, mais un complexe très mobile, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, qui mobiliserait le TBP associé à l'ADN hors des régions promotrices pour le refocaliser sur des promoteurs faibles.

Des travaux récents ont montré que NC2 α interagit avec B-TFIID et que ce contact favorise la liaison de B-TAF1 à TBP de manière ATP-dépendante. De manière surprenante ce n'est pas la fonction ATPasique de B-TAF1 qui serait impliqué dans ce phénomène (Klejman et al., 2004). Les Dr. M. MEISTERERENST et H.T.M. TIMMERS avancent deux hypothèses mutuellement exclusives pour expliquer leurs résultats. Premièrement, NC2 inactiverait la transcription en bloquant TBP sur le promoteur et servirait en même temps de marqueur de TBP inactif lié à l'ADN. B-TFIID recyclerait alors ces molécules en dissociant le complexe TBP/ADN et refocaliserait TBP au niveau de promoteurs faibles. Deuxième hypothèse, au contraire, ce serait B-TFIID qui focaliserait NC2 sur les promoteurs dont la transcription doit être arrêtée.

III

TBP

& ses

PARALOGUES.

III TBP & ses PARALOGUES

TBP est un des facteurs clés dans le contrôle de l'initiation de la transcription. TBP est en effet, présent dans au moins quatre complexes multiprotéiques impliqués dans l'initiation de la transcription : SL1 nécessaire à la transcription par la pol.I ; TFIID et B-TFIID, pour la pol.II ; le complexe TFIIB, pour la pol.III.

TBP reconnaît l'élément TATA localisé à environ 30 nucléotides en amont du site d'initiation des gènes de classe II. Il s'agit d'une protéine bipartite. Son domaine N-terminal présente une importante variabilité de séquence et de taille en fonction des espèces alors que son domaine C-terminal est très conservé au cours de l'évolution.

La forte conservation évolutive de TBP et sa présence dans les complexes d'initiation des trois ARN polymérase ont fait de TBP le « facteur de transcription universel ». La découverte de protéines apparentées à TBP et des expériences génétiques ont remis cette idée en question et démontrent que TBP joue de préférence un rôle direct dans le contrôle de la prolifération et la transformation oncogénique.

3.1) La Structure de TBP.

3.1.1 Le Domaine Amino-Terminal.

La partie N-terminale de TBP est très peu conservée au cours de l'évolution. De quelques acides aminés chez les eucaryotes inférieurs, elle peut atteindre plus de 170 résidus chez les métazoaires. Chez l'Homme, ce domaine se caractérise par la présence d'une région poly-glutamine pour laquelle il existe plusieurs allèles comportant de 28 à 42 glutamines. Des expériences *in vitro* suggéraient un rôle du domaine N-terminal de TBP dans la fixation de TBP à l'ADN et la transcription des promoteurs possédant un élément TATA (Lescure et al., 1994). Chez la Levure, la délétion de la région amino-terminale est létale seulement en combinaison avec d'autres mutations du domaine de liaison à TFIIA ou Brf1 (Lee and Struhl, 2001). D'autres études avaient mis en évidence une interaction entre le domaine N-terminal et le complexe SNAPc (*small nuclear RNA activating protein complex*), laquelle augmente la

transcription du gène U6 par la pol III (Mittal and Hernandez, 1997). En dépit des études structurales du TBP de *Saccharomyces cerevisiae* (Khrapunov et al., 2002), la fonction de ce domaine *in vivo* restait encore énigmatique.

C'est suite à la délétion du domaine amino-terminal de TBP, par recombinaison homologue chez la Souris qu'a pu être mise en évidence son implication dans un processus de rejet immunologique maternel du fœtus, (Hobbs et al., 2002). La majorité des embryons TBP^{ΔN/ΔN} meurent *in utero*, non à cause de malformations évidentes ou d'altération de la

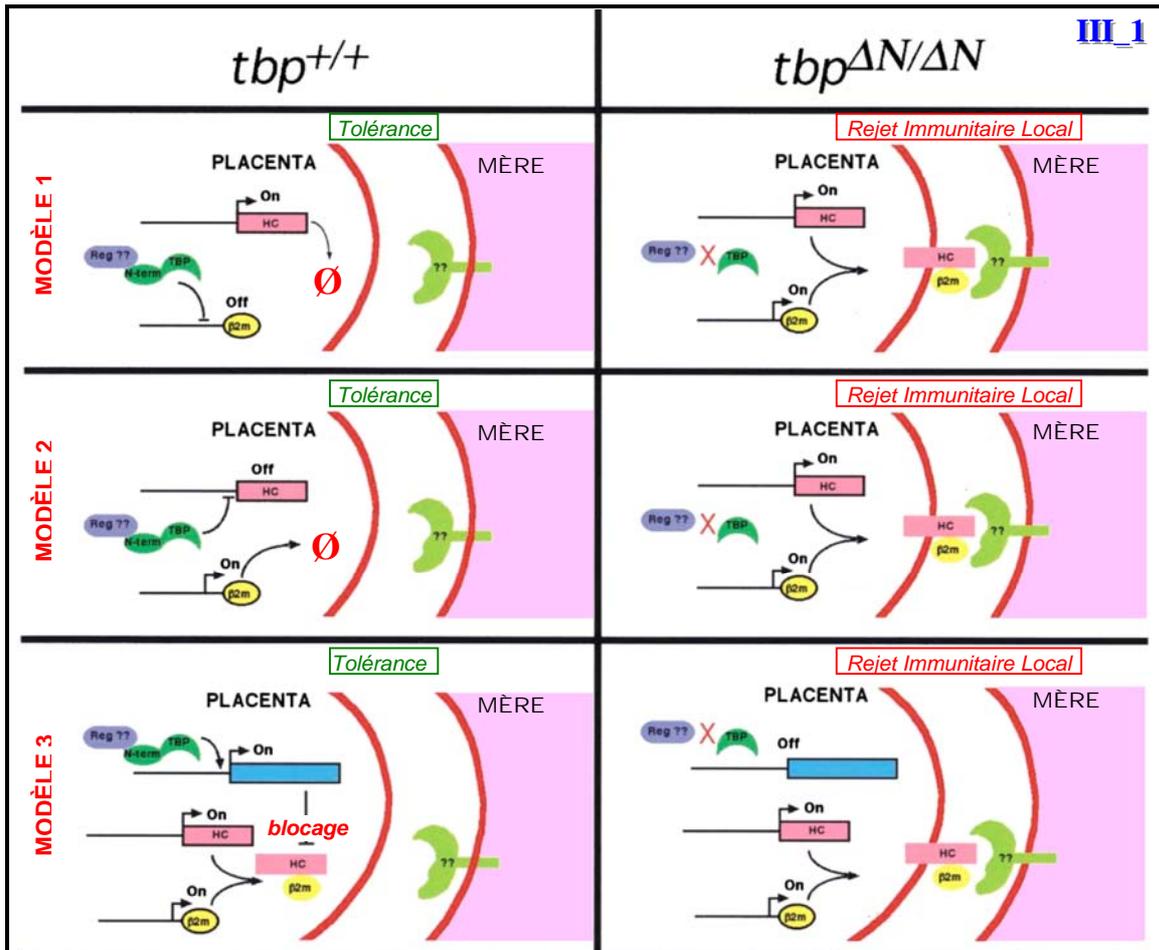


Figure III_1 – Modèles de fonctionnement de la partie aminotermine de TBP –

Le complexe majeure histocompatibilité de classe I (CMH-I) repose sur l'association de trois éléments : une chaîne lourde (HC), la β2-microglobuline (β2m) et un court peptide de 8 à 10 acides aminés. Ce court peptide résulte de la dégradation intracellulaire de protéines cytoplasmiques et est présenté par le CMH-I, généralement aux lymphocytes cytotoxiques, chargés de l'identifier comme étant du soi ou du non-soi.

Dans le **modèle 1 & 2** La formation du CMH-I est empêchée (∅) car la partie Nt de TBP réprimerait, soit l'expression du gène de la β2m (1^{er} modèle), soit un gène de chaînes lourdes spécifiquement exprimées au niveau placentaire (2nd modèle).

Dans le **3^{ème} modèle** la partie Nt de TBP contrôlerait l'expression d'un gène dont le produit interdirait la translocation du CMH-I vers la membrane cytoplasmique.

Le récepteur impliqué dans la reconnaissance de la chaîne lourde placentaire du CMH-I reste encore à caractériser.

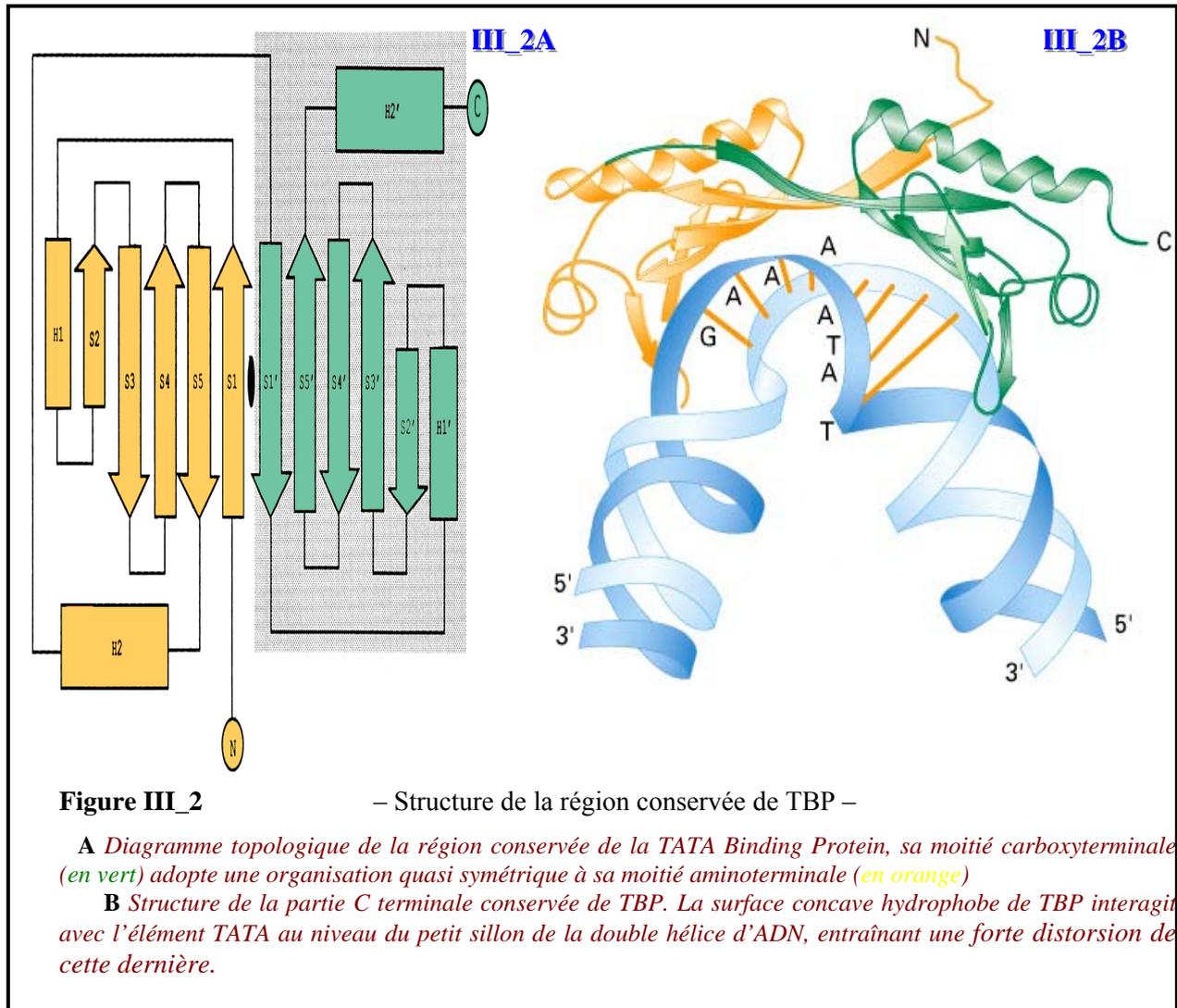
Adapté de (Hobbs et al., 2002)

transcription mais par une anomalie du placenta impliquant un défaut de l'établissement de la tolérance foeto-maternelle. Le mécanisme moléculaire de cet effet inhibiteur du rejet embryonnaire reste encore inconnu.

3.1.2 Le Domaine Carboxy-Terminal.

Le domaine carboxy-terminal de la TBP est très conservé entre les espèces et est suffisant pour permettre une activité transcriptionnelle *in vitro*. Cette partie C-terminale de TBP a fait l'objet de très nombreuses études cristallographiques. La structure de TBP a été initialement déterminée pour *Arabidopsis thaliana* (Nikolov and Burley, 1994; Nikolov et al., 1992) puis chez la Levure (Chasman et al., 1993), l'Homme (Nikolov et al., 1996), l'archéobactérie *Sulfolobus acidocaldarius* (Koike et al., 2004). TBP a été cristallisé seul ou en présence d'ADN et/ou d'autres facteurs impliqués dans la transcription tels que TFIIA (Geiger et al., 1996; Tan et al., 1996), TFIIB (Nikolov et al., 1995), NC2 (Kamada et al., 2001), TAF1 (Liu et al., 1998), Brf1 (Juo et al., 2003), etc... Toutes ces structures ont montré la même conformation pour la partie C-terminale, elle se replie de façon pseudo-symétrique, chaque moitié étant composée d'une répétition directe formée de cinq feuillets β antiparallèles et deux hélices α (cf. Fig.III_2). La forme générale de la TBP ressemble à une «selle de cheval» dont la surface convexe hydrophile est composée en partie par les quatre hélices amphipatiques et interagit aussi avec TFIIA, TFIIB et d'autres facteurs régulateurs. La surface concave de cette selle est hydrophobe et est formée par les feuillets β ; elle reconnaît l'ADN et TAFI La face concave de TBP interagit avec l'élément TATA du promoteur au niveau du petit sillon du duplex induisant une forte distorsion de l'ADN d'environ de 80° orienté vers le grand sillon.

La sélectivité de TBP pour la séquence - T₁A₂TA[T/A]AA₇[G/A]₈ - alors que du petit sillon seuls des éléments de la chaîne phosphoribose sont accessibles, s'explique en grande partie par la présence de quatre phénylalanines. Deux phénylalanines, une dans chaque pseudorépétition (hF197 & hF288), intercalent leurs chaînes latérales aromatiques entre les plateaux des bases A₇/G₈ pour hF197 et entre T₁/A₂ pour hF288, ce qui, littéralement ancre TBP à l'ADN *via* des liaisons π - π . La courbure de l'ADN provoquée par l'insertion des phénylalanines hF197 & 288 est stabilisée par l'interaction des hF214 & hF305 avec les riboses des nucléotides A₇ & A₂.



3.2) TBP dans la Transcription des Gènes de Classe I.

La transcription de l'ADN ribosomique (*ADNr*) est inhérente aux nucléoles et constitue plus de 50% de l'activité transcriptionnelle d'une cellule. Les gènes des ARN ribosomiques (*ARNr*) existent en plusieurs centaines de copie regroupés en tandems et constituent les régions organisatrices du nucléole (*NORs* : *Nucleolar Organizing Regions*). La transcription de ces gènes par l'ARN polymérase I ADN dépendante (*pol.I*) génère un transcrit primaire 47S qui après maturation au sein du nucléole donne lieu aux ARNr 28S, 18S et 5,8S. Ces ARNr avec l'ARNr 5S transcrit par l'ARN polymérase III ADN dépendante (*pol.III*), sont les composants architecturaux et catalytiques majeurs des ribosomes (Moore and Steitz, 2002) (cf. IV.2.5 Le Nucléole).

Le promoteur des gènes des ARNr adopte une organisation bipartite. Il compte d'une part, un élément promoteur de base (*CPE* : *Core Promoter Element*) qui entoure le site d'initiation de la transcription et d'autre part, en amont du CPE, un élément de contrôle

(UCE : *Upstream Control Element*) chez les mammifères ou une séquence d'activation ascendante (UAS : *Upstream Activating Sequence*) chez la Levure. Le CPE est essentiel pour une initiation précise de la transcription alors que l'UCE n'est pas nécessaire à l'initiation de la transcription mais exerce un fort effet stimulateur sur cette dernière. La distance entre ces deux éléments ainsi que leur orientation mutuelle sont des paramètres cruciaux pour la fonctionnalité des promoteurs des gènes ribosomiques. Outre ces séquences CPE et UCE, il existe des séquences distales d'activation (*distal enhancer-like sequences*) qui augmenteraient la probabilité d'une formation stable du complexe de pré-initiation de la pol.I sur le promoteur des ADNr (Reeder, 1999). Malgré l'apparente conservation de l'organisation et de la fonction des promoteurs des gènes des ARNr, aucune conservation de séquence de la Levure à l'Homme n'a pu être mise en évidence dans cette région. La seule similitude de séquence entre ces promoteurs est une importante proportion de déoxynucléotides A/T autour du site d'initiation, certainement afin de favoriser l'ouverture de la double hélice d'ADN.

Chez l'Homme le facteur de sélectivité-1 (SL1 : *SeLectivity factor 1*) reconnaît le CPE et est suffisant pour induire un niveau basal de transcription. Ce complexe de 300KDa contient TBP et au moins trois facteurs associés (*TAF_{7s}*) hTAF₁₁₀, hTAF₆₈ et hTAF₄₈. SL1 est également identifié chez la Souris sous la dénomination de facteur d'initiation de la transcription-IB (*TIF-IB : Transcription Initiation Factor-IB*) et chez la Xénope sous celle de Rib1.

Le facteur de liaison en amont (*UBF : Upstream Binding Factor*) est un autre facteur nécessaire à une transcription active des gènes des ARNr. Cette protéine comporte six domaines à mobilité élevée (*HMG : High mobility group*) qui vont lui permettre de lier l'ADN. UBF, sous forme homodimérique, différencie ainsi l'UCE du reste du promoteur et organise l'ADN de cette région sous la forme d'une boucle à une spire de 140pb qui se replie sur elle-même (Bazett-Jones et al., 1994). L'homodimère UBF va stabiliser SL1 sur le promoteur *via* des interactions entre ses extrémités carboxy-terminales et TAF₄₈ d'une part, TBP, d'autre part. SL1 va à son tour recruter la pol.I sur le promoteur grâce à des interactions entre TAF₆₈, TAF₁₀₀ et le facteur associé de la pol.I, RRN3/TIF-IA (*cf. Fig.III_3*). Le dégagement du promoteur par la pol.I constitue l'étape limitante de la transcription des gènes de classe I. Il a été proposé qu'*in vitro*, la principale action d'UBF serait de favoriser cette étape (Russell and Zomerdijk, 2005).

III_3A

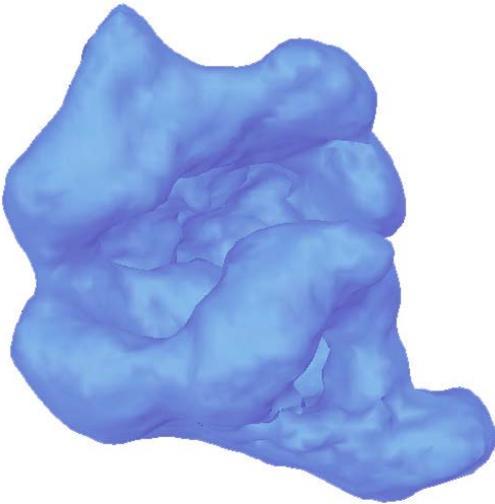


Figure III_3 – La Transcription par l'ARN polymérase I –

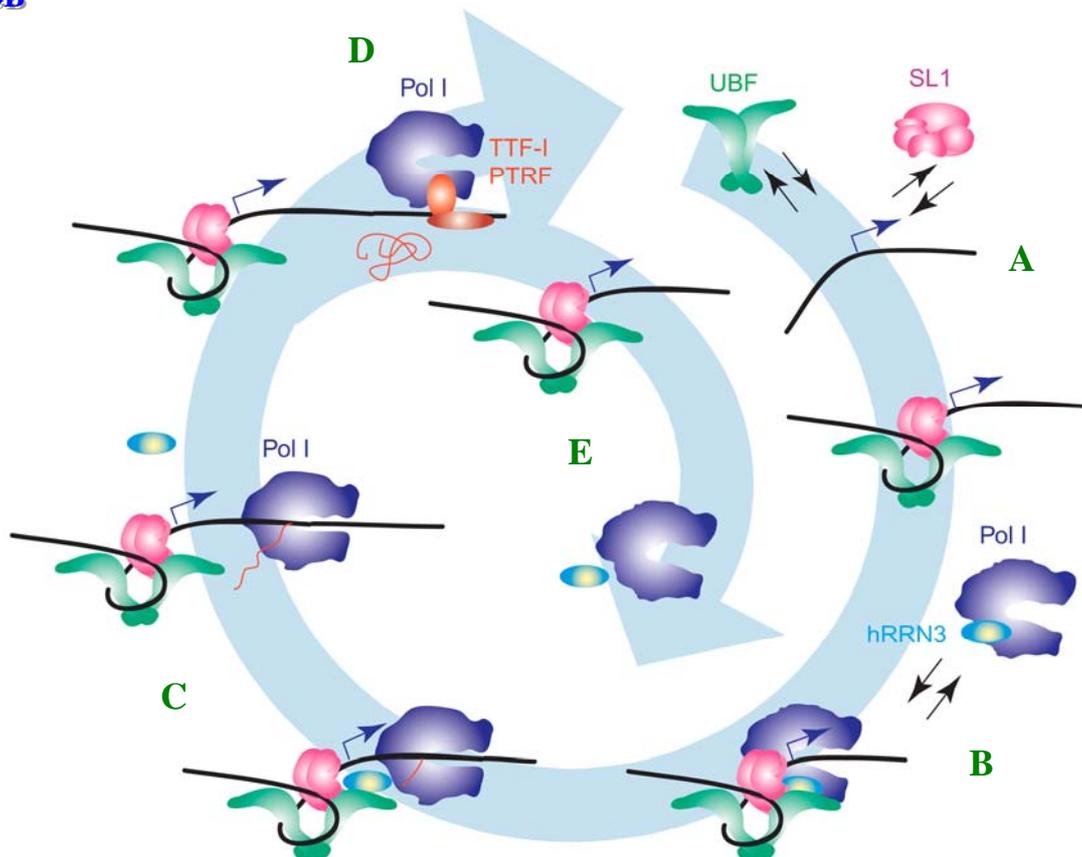
A Structure de l'ARN polymérase I en microscopie électronique.

B L'initiation de la transcription par la pol.I débute avec la reconnaissance du promoteur par les facteurs UBF et SL1/TIF-IB (**A**). RRN3/TIF-IA amène la pol.I au niveau du site d'initiation, cette étape est extrêmement régulée (**B**). RRN3/TIF-IA est la cible terminale de nombreuses voies de signalisation liées aux stress. La phosphorylation de RRN3/TIF-IA l'empêche de recruter la pol.I (Mayer et al., 2005; Yuan et al., 2005). Le départ de RRN3/TIF-IA est nécessaire pour que la pol.I puisse entrer en phase d'élongation (**C**). TTF-I & PTRF sont des facteurs de terminaison qui permettent entre autre le recyclage de la pol.I. (**D**). Pendant l'élongation UBF & SL1 restent en place sur le promoteur ce qui permet d'initier un nouveau cycle de transcription (**E**).

A Avec l'amicale autorisation du Dr. Patrick SCHULTZ

B Adapté de (Russell and Zomerdijk, 2005)

III_3B



3.3) TBP dans la Transcription des Gènes de Classe III.

L'ARN polymérase III ADN dépendante (*pol.III*) est la plus volumineuse des trois ARN polymérases alors que les transcrits qu'elle engendre ne dépassent guère 400pb et ne

sont jamais traduits. La pol.III transcrit une variété éclectique de gènes qui ont tous en commun de coder des ARNs qui ont des fonctions structurales, ou catalytiques impliquées dans des processus métaboliques fondamentaux. C'est ainsi que la pol.III se consacre à la transcription des ARNs de transfert (*ARN_t*), de l'ARN ribosomique 5S et de certains petits ARN nucléaires.

Les promoteurs des gènes de classe III sont principalement subdivisés en trois catégories. Les promoteurs des type 1 et 2, se situent dans la partie transcrite du gène et ne possèdent généralement pas de boîte TATA, ceux de type 3, se trouvent en amont du site d'initiation et portent un élément TATA.

Le seul représentant des promoteurs classe III du type 1 est celui du gène de l'ARNr 5S. Initialement caractérisé chez le Xénope (Bogenghagen et al., 1980; Sakonju et al., 1980), ce promoteur est constitué d'un élément intermédiaire, flanqué d'une boîte A en amont et d'une boîte C en aval. Ces trois séquences constituent la région interne de contrôle de l'initiation de la transcription du gène (*ICR : Internal Control Region, cf. Fig.III_4*).

La majorité des promoteurs qui dirigent la transcription des gènes des ARN_t sont de type 2. Le promoteur de type 2 est constitué d'une boîte A et d'une boîte B, chacune étant extrêmement bien conservée puisque ces séquences codent pour les bras D et T des ARN_t. L'espacement entre ces éléments varie pourtant d'un promoteur à l'autre. Il a été montré que les boîtes A des promoteurs de type 1 et 2 sont interchangeable chez le Xénope (Ciliberto et al., 1983), mais que cette similarité de séquence ne traduit pas une similarité fonctionnelle car, nous allons voir que ces deux éléments recrutent des facteurs multiprotéiques différents lors de l'initiation de la transcription.

Une minorité de gènes transcrits par la pol.III possède une organisation du promoteur différente de celles présentes dans le type 1 ou 2. Les promoteurs de type 3 ont été trouvés uniquement chez les vertébrés dans des gènes codant pour des petits ARNs nucléaires tel que U6, 7SK, H1. Les composants de ce promoteur qui régissent l'initiation de la transcription consistent en un élément proximal (*PSE : Proximal Sequence Element*), une boîte AT-riche localisée en aval du PSE et un élément distal (*DSE : Distal Sequence Element*).

Les promoteurs de certains gènes transcrits par la pol.III ont des structures qui ne peuvent être classées dans les trois types décrits ci-dessus. Par exemple, le gène EBER2 du virus d'Epstein Barr contient les éléments A et B caractéristiques des promoteurs de type 2, mais il contient également une boîte TATA entre les nucléotide -28 et -23 (Howe and Shu, 1989).

Les facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription par la pol.III sont aux nombres de trois : TFIIA TFIIB et TFIIC.

TFIIA est une protéine à doigt de zinc C_2H_2 peu commune puisqu'elle en possède neuf. Cela lui permet de reconnaître de façon spécifique et avec une grande affinité, aussi bien l'ADN que l'ARN (Setzer et al., 1996). La séquence de TFIIA n'est que pauvrement conservée au cours de l'évolution, y compris entre vertébrés.

TFIIB peut être séparé par chromatographie en deux fractions appelées TFIIB α et TFIIB β (Teichmann and Seifart, 1995). — La nomenclature unifiée proposée par le Dr I.M. WILLIS est, ici, utilisée pour nommer les sous-unités de ces complexes (Willis, 2002). — TFIIB α résulte d'associations lâches entre TBP, Brf2 (*TFIIB Related Factor*) et Bdp1 (*BromoDomain Factor 1*); ce complexe active la transcription des promoteurs de type 3. TFIIB β , composé de TBP, Brf1 et Bdp1 participe au contraire à l'initiation de la transcription des promoteurs de type 1 et 2.

Chez les eucaryotes supérieurs, TFIIC est également subdivisée en deux fractions par chromatographie, nommées TFIIC1 et TFIIC2 (Dean and Berk, 1987; Yoshinaga et al., 1987). TFIIC1 contient une isoforme de Bdp1 de 250kDa (Weser et al., 2004), mais sa composition complète n'a pas encore été déterminée avec précision. TFIIC1 est impliqué dans le recrutement de la pol.III quelque soit le type de promoteur (Oettel et al., 1997). TFIIC2 est un complexe stable de cinq sous-unités, engagé dans l'initiation de la transcription des promoteurs des types 1 et 2.

L'initiation de la transcription par la pol.III est régie par la structure du promoteur du gène de classe III.

Pour les promoteurs de type 1, l'ICR est reconnu par TFIIA et permet l'ancrage à l'ADN de TFIIC (TFIIC1 et TFIIC2 réunis). Cet échafaudage permet le recrutement de TFIIB β qui à son tour dirige la pol.III sur le promoteur.

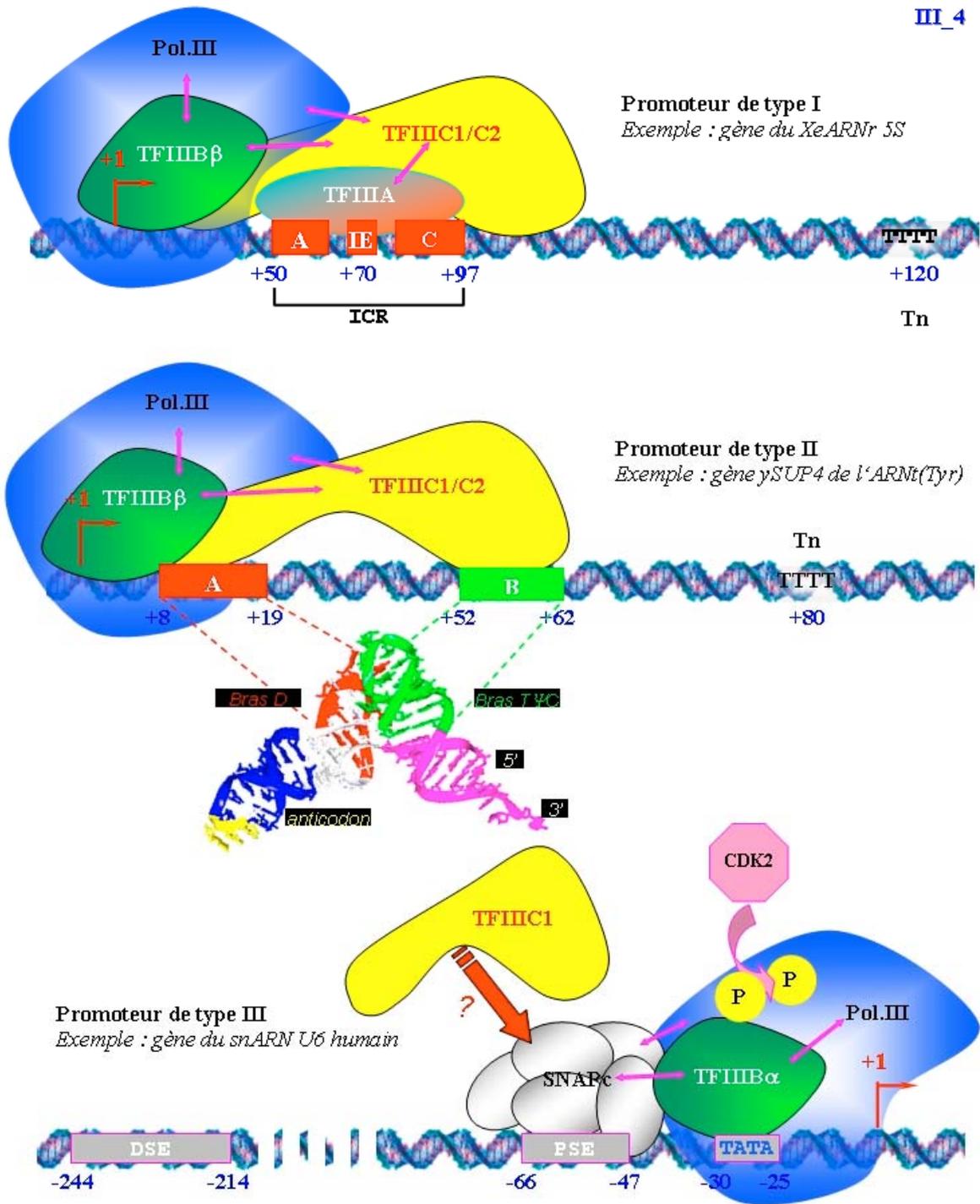


Figure III_4 – Les Promoteurs des gènes transcrit par l'ARN polymérase III –

Sur cette page sont présentés des exemples des trois principaux types de promoteurs et des facteurs qui leur sont associés pour diriger la transcription par la pol.III. Le promoteur du gène de l'ARNr 5S est le seul représentant du type I. Les régions A & B qui conduisent la transcription des promoteurs de type II codent pour les bras D & T des ARNt. La phosphorylation de la pol.III par CDK2 est une étape indispensable à l'élaboration d'un PIC actif sur le promoteur du gène U6. Les flèches roses représentent des interactions protéine/protéine.

Dans le cas des promoteurs de type 2, TFIIC (C1+C2) lie directement les boîtes A et B. TFIIC2 reconnaît préférentiellement la boîte B mais TFIIC1 stabilise sa liaison avec le promoteur. Un fois TFIIC lié au promoteur de type 2, la mobilisation du TFIIB β et de la pol.III s'effectue de manière similaire à celle décrite pour le promoteur du gène de l'ARNr 5S.

La mobilisation de la pol.III par les promoteurs de type 3 nécessite la reconnaissance du PSE par un complexe spécifique de liaison (*PBP : PSE Binding Protein*) tel que SNAP_c (*SNAP_c : snRNA Activating Protein Complex*), ainsi que la liaison du TFIIB α à l'élément TATA via TBP. TFIIC1 renforce la liaison du PBP à l'ADN mais son intégration dans cet ensemble de pré-initiation n'a pas encore été décrite précisément. La liaison du PBP et du TFIIB α à la région promotrice conduit à l'arrivée de la pol.III. La phosphorylation de la pol.III par la caséine kinase 2 (*CK2*) serait une étape obligatoire dans l'élaboration du PIC sur de tels promoteurs (Hu et al., 2003).

3.4) TBP dans la Prolifération Cellulaire et la Transformation Oncogénique.

Le gène codant pour TBP a été invalidé dans des cellules de Poulet et chez la Souris. L'inactivation d'un des allèles de TBP dans les cellules DT40 provoque un ralentissement du cycle cellulaire et une augmentation de l'apoptose (Um et al., 2001), dûs à une baisse de l'expression de la phosphatase Cdc25B, ce qui entraîne une augmentation de la forme phosphorylée, donc inactive, de Cdc2.

Chez la Souris, les animaux TBP hétérozygotes sont normaux et fertiles, mais après croisement, aucune Souris *tbp*^{-/-} n'est détectée. Dans les embryons *tbp*^{-/-}, la prolifération cellulaire s'arrête entre le stade huit cellules et blastocyste avec la déplétion du TBP maternel (Martianov et al., 2002b). Les blastocystes *tbp*^{-/-} mis en culture meurent par apoptose après 48 heures. Or, malgré l'impossibilité de détecter TBP dans ces blastocystes, une abondante transcription par la pol.II, comparable à celle des cellules sauvages est observée. L'arrêt de la prolifération n'est donc pas la conséquence de l'absence de la transcription pol.II, mais plutôt celle de l'absence de mécanismes de transcription spécifique, nécessaires au déroulement du

cycle cellulaire. Il y a en effet un arrêt de la transcription par les ARN pol.I et pol.III dans ces cellules.

La croissance et la prolifération cellulaire chez les eucaryotes sont liées aux taux de transcription par les pol.I et III. La production d'ARNr est l'étape limitante dans la formation des ribosomes (Liebhaber et al., 1978) et par voie de conséquence, l'étape limitante dans la synthèse des protéines car le nombre de molécules d'ARNm excède le nombre de ribosomes. La transcription par les pol.I et III est, de plus, considérablement accrue dans les cellules cancéreuses. Il a été enfin mis en lumière ces dernières années que les mécanismes de transcription de la pol.I et III sont contrôlés par de multiples facteurs de régulation du cycle cellulaire. C'est ainsi que les complexes SL1 et TFIIB, contenant TBP, seraient les cibles de protéines suppresseurs de tumeur ou d'oncoprotéines.

La protéine p53 est capable d'inhiber la transcription de la pol.I et III en interagissant avec SL1 ou directement avec TBP au sein de TFIIB, ceci empêchant la formation des complexes de pré-initiation (Johnson et al., 2003b). De la même manière la protéine Rétinoblastome (*Rbp*), en se liant à TFIIB, prévient son interaction avec TFIIC. Rbp inhibe d'ailleurs la transcription par la pol.I en agissant indirectement sur SL1. Rbp, en interférant dans la liaison avec UBF, interdit à ce dernier toute stimulation de SL1, ce qui réduit considérablement l'efficacité de transcription par la pol.I (Hannan et al., 2000). L'inhibition de la voie de transduction PI3K/Akt/mTOR/S6K par la protéine suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) conduit aussi à une dissociation du complexe SL1 (Zhang et al., 2005).

Puisque le niveau de TBP est augmenté dans les cellules suite à une exposition à l'EGF (*Epidermal growth factor*) (Zhong et al., 2004) ou dans les cellules transformées par l'oncogène Ras (Johnson et al., 2003a), TBP pourrait aussi intervenir directement dans la régulation du cycle cellulaire. De plus, La kinase ERK (*Extracellulaire signal-Regulated Kinase*), effectrice finale de la voie de signalisation Ras, est capable de lier et de phosphoryler RRN3, UBF et TFIIB. Ces phosphorylations ont un effet fortement stimulateur sur les activités des pol.I et III (Felton-Edkins et al., 2003; Stefanovsky et al., 2001). La protéine c-Myc, qui est aussi une cible d'ERK, est également capable d'augmenter le taux de transcription de la pol.I en induisant une surexpression d'UBF et en contactant SL1, ce qui favorise sa liaison aux promoteurs (White, 2005). c-Myc, active aussi la transcription des gènes de classe III, y compris lorsque leurs promoteurs ne possèdent pas la séquence d'ADN reconnue par c-Myc, c-Myc pouvant interagir avec TFIIB (Gomez-Roman et al., 2003).

Les transcriptions par les pol.I et III pourraient donc constituer des voies d'arrêt du cycle cellulaire mais une activation des pol.I et III est une nécessité pour répondre au métabolisme accéléré des cellules cancéreuses. On ne peut donc pas exclure que ce phénomène soit un effet de l'oncogenèse et non à son origine. Il est tout à fait envisageable que TBP contrôle l'expression de gènes de classe II spécifiquement impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et dont les produits influenceraient directement ou indirectement les mécanismes de transcription par les pol.I et III. Quoi qu'il en soit, le fait que TBP puisse être négativement ou positivement régulée par, respectivement, des répresseurs de tumeur ou des agents oncogéniques, remet en cause notre compréhension du fonctionnement moléculaire de TBP. Ces observations démontrent que TBP est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et l'oncogenèse.

3.5) Cartographie des Sites d'Interaction de TBP.

La partie conservée de TBP a fait l'objet de si nombreuses études de mutagenèse dirigée ou aléatoire, parfois leurs conclusions ont été tellement contradictoires, qu'il est difficile d'écrire une synthèse de l'ensemble de ces travaux. Néanmoins la détermination de plusieurs structures de TBP interagissant avec ses partenaires, en diffraction des rayons X ou en RMN, a permis de mieux comprendre le contexte moléculaire dans lequel se trouve TBP et d'établir une cartographie précise de ses domaines d'interaction.

TBP interagit avec l'ADN au niveau de sa face concave constituée par ses feuillettes β S2 ;S3 ;S4 ;S5 ;S1 ;S1' ;S5' ;S4' ;S3' (cf. Fig.III_5). De nombreuses mutations situées dans cette région ont été caractérisées pour leur capacité à diminuer la liaison au promoteur et sa spécificité (Arndt et al., 1995; Arndt et al., 1994; Lee and Struhl, 1995; Reddy and Hahn, 1991). Lors de l'initiation de la transcription, TBP doit reconnaître le promoteur de manière à le polariser. Or TBP est une protéine pseudo-symétrique et le petit sillon de la boîte TATA est également quasi-symétrique. Il a été proposé par les Dr. J.V. SPENCER et K.M. ARNDT qu'en absence de tous GTFs, l'orientation de TBP sur l'ADN est dictée par les acides aminés yA100 (hA198) et yP191 (hP289) positionnés de manière analogue dans chaque étrier. En effet ces résidus, dans leurs différences conformationnelles, altèrent la symétrie de TBP. Chez la Levure, le mutant de TBP yA100P est capable ainsi d'initier la transcription à partir d'éléments TATA inversés de type 5'– CTTTATA – 3' (Spencer and Arndt, 2002).

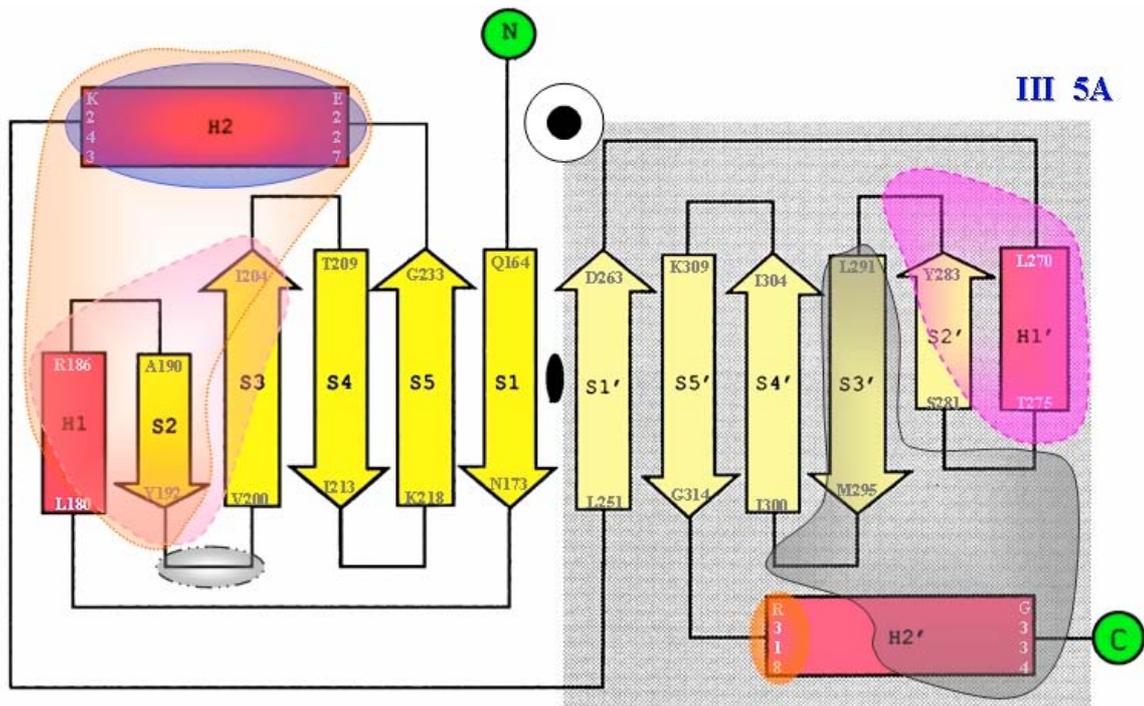
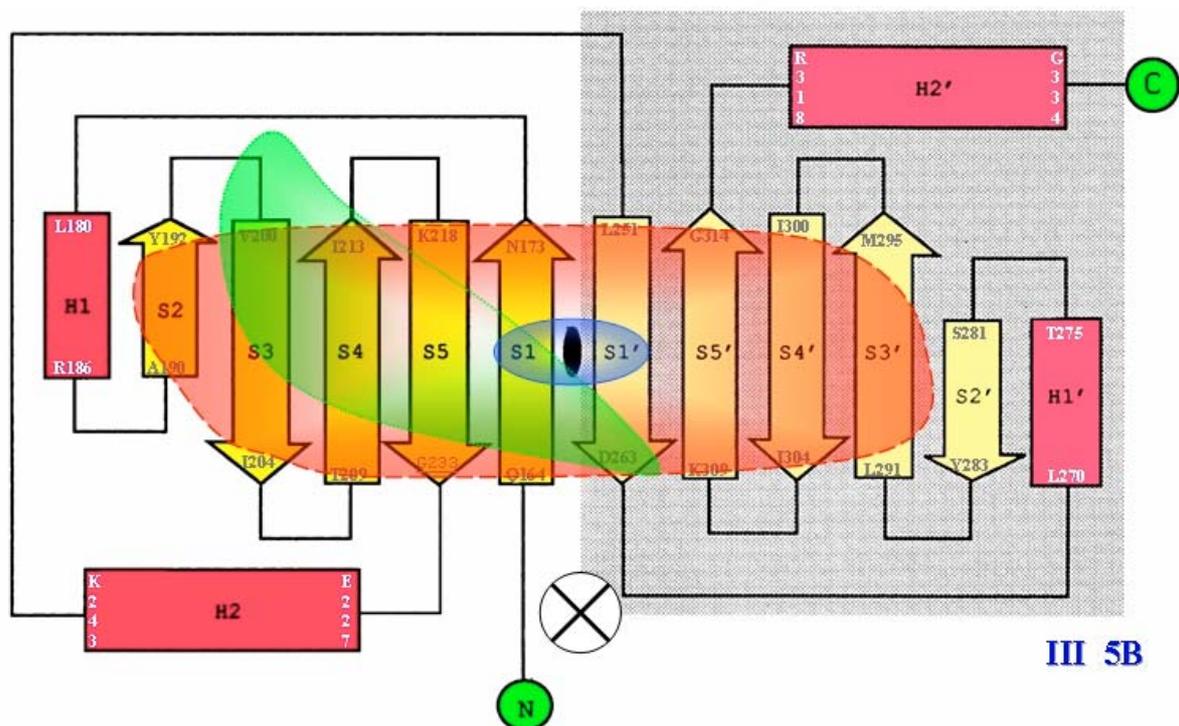


Figure III_5 – Cartographie des sites d'interactions de TBP –
Diagramme topologique de TBP vue depuis sa face convexe A ou concave B. De nombreuses études cristallographiques ont montré les régions de TBP impliquées dans des contacts avec divers partenaires. Ce sont ces régions qui sont ici schématisées.

- ▭ ↑ zone reconnue par Brf1
- ▭ ↓ domaine de contact à l'ADN
- ▭ ↓↑ résidus importants pour la liaison de B-TAF1, déterminés par mutagenèse.
- ▭ ↓ surface liée par TAF1
- ▭ ↑ aire d'ancrage à TFIIB
- ▭ ↑ aire d'ancrage à TFIIA
- ▭ ↑ surface contactée par NC2 β
- ▭ ↑ surface contactée par NC2 α



De façon remarquable, l'extrémité N-terminale de TAF1 est capable de mimer la surface d'interaction présentée par l'ADN à TBP. En interagissant avec les feuillets β S3 ;S4 ;S5 ;S1 ;S1' de la face concave de TBP, l'extrémité N-terminale de TAF1 inhibe l'interaction TBP/ADN (Liu et al., 1998). Force néanmoins est de constater que TFIID interagit bel et bien avec le promoteur ce qui signifie que cette interaction est certainement transitoire et que TAF1 se lie à TBP en d'autres endroits, qui, comme pour les autres TAFs, n'ont pas encore été clairement définis.

TFIIA contacte la face convexe TBP *via* le premier étrier, H1 ;S2 et S3. Diverses mutations de H2 ont été rapportées comme altérant la liaison TBP/TFIIA (Buratowski and Zhou, 1992; Stargell and Struhl, 1995) alors que cette hélice n'établit pas d'interaction physique avec TFIIA dans les différents cristaux réalisés jusqu'à lors (Bleichenbacher et al., 2003; Geiger et al., 1996; Tan et al., 1996). Ceci pourrait s'expliquer par l'absence dans ces complexes ternaires DNA/TBP/TFIIA cristallisés d'une longue séquence aminotermine de TFIIA β susceptible d'influencer les contacts TBP/TFIIA.

TFIIB lie le deuxième étrier, S2' ;H1' de l'extrémité C-terminale de TBP. Plusieurs mutations décrites dans cette région affectent la formation du complexe TBP/TFIIB (Kim et al., 1994; Lee and Struhl, 1995). Le résidu hE284 du deuxième étrier de TBP est par exemple, engagé dans un pont salin avec hF195 TFIIB ; la mutation hE284R empêche dans les cellules HeLa la liaison de TFIIB à TBP, ce qui abolit toute activation de la transcription par CTF ou VP16 (Tansey and Herr, 1997).

NC2 est un hétérodimère [NC2 α /NC2 β] connu pour inhiber l'incorporation de TFIIA et de TFIIB dans le PIC. La structure cristallographique du complexe ternaire NC2/TBP/ADN montre que NC2 α contacte TBP au niveau du premier étrier alors que NC2 β recouvre la face convexe de TBP d'une longue hélice α qui interagit avec H2' ;S3' ;S2' (Kamada et al., 2001). Même si les acides aminés impliqués dans la liaison TBP/NC2 ne sont pas les mêmes que ceux nécessaires à la formation du complexe TFIIA/TBP/TFIIB, il faut garder à l'esprit que les résidus de NC2 qui ne contactent pas directement TBP génèrent un encombrement stérique qui empêche l'accès de TFIIA et de TFIIB à leur site de liaison.

L'identification de l'interface entre TBP et B-TAF1 a été mise en évidence par des études de mutagenèses dirigées des résidus de TBP exposés au solvant. Ces études ont montrées que les Lys de l'hélice α H2 de TBP sont cruciales pour cette interaction. Il semblerait également que B-TAF1 contacte TBP au niveau de sa face concave puisque B-TAF1 ne peu lier le mutant TBP *spm3* (cf. §III.6 TBP *spm3*) (Pereira et al., 2003).

← Figure III_6 – Alignement de Séquence Entre Orthologues & Paralogues de TBP –

Sur cet alignement de séquence entre les régions conservées de la protéines TBP dans diverses espèces et leurs paralogues, est notifiée la structure secondaire du TBP humain (code d'identification PDB : 1CDW).

Les acides aminés impliqués dans la reconnaissance du promoteur AdML sont indiqués en fonction de l'élément de l'ADN qu'ils reconnaissent.

Les résidus de TBP engagés dans des interactions avec TFIIA, TFIIB, TAF1, B-TAF1, NC2 et Brf1, tel que les études cristallographies les décrivent, sont également signalés.

Certaines substitutions de résidus du TBP humain conduisent à la déstructuration de cette protéine d'après (Bryant et al., 1996). Ces résidus sont indiqués par une barre noire.

Abréviations taxonomiques : tc, Trypanosoma cruzi – lm, Leishmania major – tb, Trypanosoma brucei – M, Mus musculus – gg, Gallus gallus – h, Homo sapiens – xe, Xenopus laevis – ze, Danio rerio – d, Drosophila melanogaster – ce, Caenorhabditis elegans – y, Saccharomyces cerevisiae – at, arabidopsis thaliana.

3.6) Le TBP spm3.

Une étude de mutagenèse du gène SPT15 codant pour le TBP de Levure a permis d'identifier un dérivé de TBP dont la spécificité de fixation à l'élément TATA est altérée. Appelé TBP spm3 (*altered SPecificity Mutant 3*), ce mutant porte la triple substitution yI194F, yV203T et yL205V (*hI292F, hV301T, hL303V*). Situées dans le domaine de liaison à l'ADN (*cf. Fig.III_6*), ces mutations n'affectent pas l'interaction avec l'élément TATA du promoteur, mais confèrent la capacité de reconnaître la boîte TATA non canonique 5' – TGTA – 3' (Strubin and Struhl, 1992).

Ce variant est fréquemment employé dans des études de transcription spécifique, grâce à l'utilisation d'un gène rapporteur, celui de la luciférase par exemple, placé sous le contrôle d'un promoteur dont l'élément TATA a été modifiée en TGTA. La transcription de ce gène rapporteur ne pourra se faire que *via* du TFIID néoformé ayant intégré le TBP spm3, étant donné que le promoteur modifié n'est alors plus reconnu par la TBP endogène (Lavigne et al., 1999).

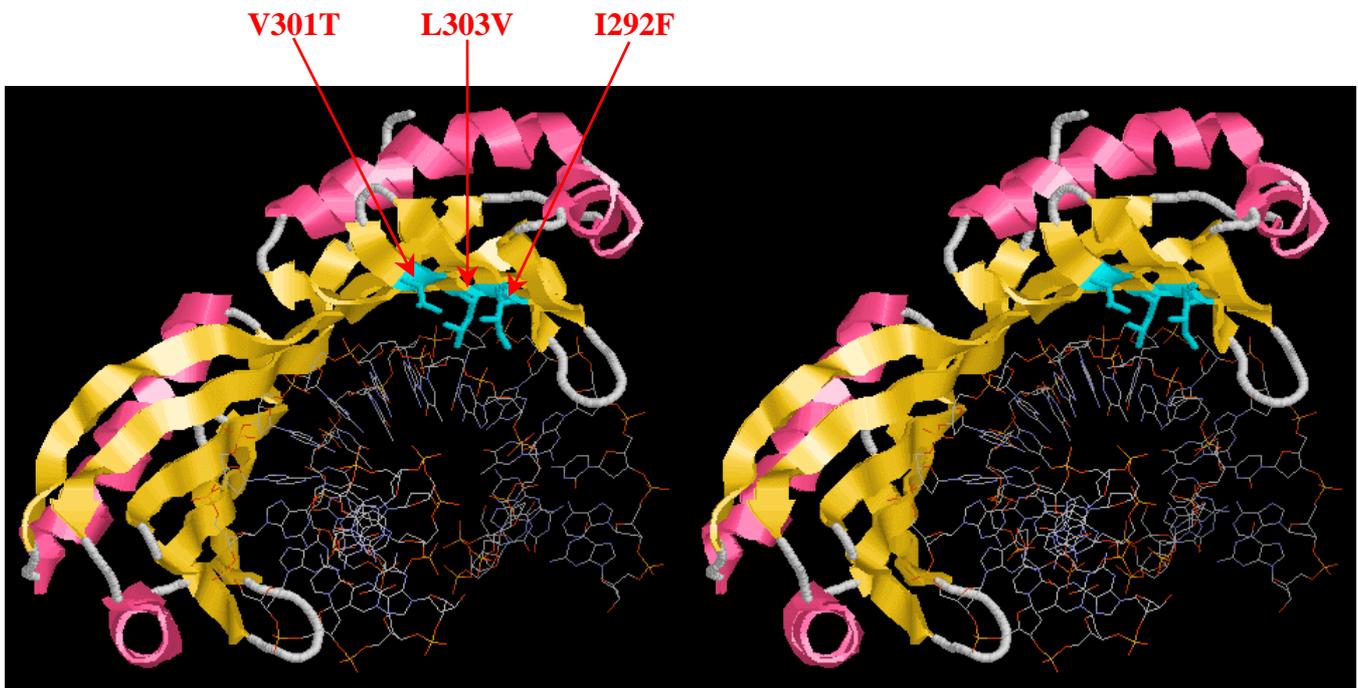


Figure III_7 - Vue stéréoscopique du TBPspm3 humain -

Les substitutions I292F, V301T et L303V, en cyan sur la figure, se localisent au niveau de la face concave de TBP. Cette surface hydrophobe est impliquée dans les interactions de TBP avec l'ADN. Ainsi hTBPspm3 est non seulement capable de reconnaître la boîte TATA du promoteur mais également la boîte non canonique TGTA.

3.7) Mutagenèse des Acides Aminées à la Surface de TBP par G.O. Bryant & Co.

Dans une étude réalisée par le Dr. G.O. Bryant et ses collaborateurs en 1996, les acides aminés de la région conservée du TBP humain, non impliqués dans la liaison de TBP à l'ADN, sont ici successivement mutés. Afin de rompre les interactions électrostatiques entre les acides aminés de TBP et ceux d'éventuels partenaires, les résidus chargés de TBP furent remplacés par des résidus de charges opposées, (*les lysines et les arginines par des acides glutamiques ; les acides glutamiques et aspartiques par des arginines*). Les résidus non chargés ont été remplacés par des résidus plus volumineux, arginine ou acide glutamique, pour introduire une gêne stérique supplémentaire.

Un nombre de 89 mutants a été ainsi généré. Pour chaque mutant la capacité à lier l'élément TATA en présence ou en absence de TFIIA et/ou TFIIB a été évaluée par retard sur gel et le niveau de transcription basale a été déterminé *in vitro*. En plaçant ces mutants dans un contexte spm3, les auteurs ont déterminé de manière quantitative, *in vivo*, leur capacité à supporter une transcription activée.

Le système retenu par le Dr. G.O. BRYANT est celui du gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur soit du gène c-fos, soit du gène du récepteur β à l'acide rétinoïque dont les éléments TATA ont été modifiés en TGTA. L'existence de séquences de liaison de GAL4 en amont du promoteur minimal modifié, permettent à la protéine de fusion GAL4-VP16 ou GAL4-E1A d'activer la transcription du gène de la luciférase. De cette façon, la mesure 48^H après transfection, dans des cellules COS, de l'activité luciférase des plasmides d'expression du TBP spm3 muté et de la protéine de fusion GAL4-activateur ainsi que celle du plasmide rapporteur, est le reflet de l'aptitude d'un mutant à initier une transcription activée.

Parmi ces 89 mutants, 14 sont complètement inaptes à lier l'ADN que ce soit en présence ou en absence de TFIIA et/ou TFIIB. Les mutations correspondantes hL165E, hR188E, hA190E, hY192E, hI201D, hR203E, hG223R, hF253E, hF266E, hY283E, hP285E, hK316E, hE320R, hY329E ne se localisent pas au niveau de l'interface TBP/ADN. Il a donc été conclu que ces mutations déstabilisent l'ensemble de la protéine, ce qui rend TBP incapable de reconnaître l'élément TATA et de contacter ses partenaires.

	c-fos GAL4-E1A	c-fos GAL4-VP16	β -retinoic AR GAL4-E1A	β -retinoic AR GAL4-VP16	<i>in vitro</i> <i>Txn</i>	TATA	TBP + TFIIA	TBP + TFIIB	TBP + TFIIA&B	TFIIA column
	spm3	100	100	100	100	+	+	+	+	100
	S156E	69±23	79±17	85	29±6	+	+	+	+	119
	E157R	26±6	35±20	60±19	118±31	78±6	+	+	+	83
	S158E	64±30	51±11	65±17	104±18	112	+	+	+	218
	S159E	117±71	115±25	91±25	121±26	69±17	+	+	+	55
	I161R	29±14	22±27	39±15	47±1	16±22	-	+/-	+/-	38±7
	V162R	105±24	89±35	92±26	126±54	78±44	+	+	+	49
S1	L165E	7±4	4±5	18±8	-5±10	-7±3	-	-	-	22±15
S1	N173E	52±13	58±23	94±35	147±01	44	+	+	+	58
	G175R	18±11	23±9	41±18	78±14	19±12	-	+	+	67±19
	C176R	9±4	6±7	19±5	28±7	15±15	-	+	+	23±9
	K177E	72±35	123±42	94±14	102±34	68±9	+	+	+	81±33
	D179R	60±13	100±45	54±8	102±10	2±3	-	+/-	-	64
H1	K181E	39±4	56±12	57±9	118±32	118±17	+	+	+	69
H1	A184E	1±3	5±4	4±5	-2±12	-5±9	+/-	-	+	21±11
H1	L185E	67±17	77±12	104±31	149±14	114	+	+	+	135±75
H1	R186E	160	126±23	105±19	113±1	75±42	+	+	+	49
	R188E	-1±2	1±5	-1±3	-5±9	3±7	-	-	-	28±27
	N189E	-1±0	-4±2	-2±1	-4±2	46±8	-	-	+	19±8
S2	A190E	6±2	14±2	9±6	14±19	0±8	-	-	-	15±4
S2	E191R	1±1	2±2	-3±3	-13±4	68±34	+	-	+	31±1
S2	Y192E	20±2	26±26	11±9	7±14	-5±6	-	-	-	15±2
étrier	N193R	26±26	53±12	50±21	145±51	47±14	+	+	+	71
étrier	P194E	38±15	48±23	69±31	103±2	67±23	+	+	+	82
étrier	K195E	72±6	66±26	99±33	85±3	88±8	+	+	+	120±12
S3	I201D	2±1	3±4	7±7	-5±3	0±18	-	+/-	-	21±3
S3	R203E	-3±2	-2±6	-5±2	-6±5	1±6	-	-	+	74±15
	R205E	1±2	5±2	1±4	5±3	98±36	-	-	+	16±6
	E206R	139±45	119±36	124±16	75±11	88±47	+	+	+	141
	R208E	78±36	72±24	76±13	114±22	123±11	-	+	+/-	63
	S215E	66±26	73±30	116±36	197±50	58±30	+	+	+	81
	S216R	36±12	60±10	68±31	151±48	6±10	-	+/-	-	59
	G223R	9±5	2±2	11		10±6	-	-	-	
H2	E227R	39±19	50±31	37±6	70±11	0±9	-	-	-	19±8
H2	E228A	78±36	139±45	139±45	139±45	0±10	-	+	+/-	45
H2	R231E	19±9	25±22	23±8	102±31	87±23	+	+	+	26±9
H2	L232E	64±6	50±7	62±4	100±19	30±21	-	+	+	81
H2	R235E	1±0	3±2	6±4	18±2	127±22	-	+	+	27±25
H2	K236Q	37±9	103±17	49±13	76±25	98±25	-	+	+	73±29
H2	R239S	3±1	5±1	8±4	31±16	100±64	-	+	+	26±12
H2	V240Q	57±19	69±32	74±10	137±19	115±2	+	+	+	64
	L244E	32±1	38±5	61±23	59±5	3±6	-	+/-	-	33±5
	G245E	50±10	71±31	73±10	53±13	1±1	-	+	-	33±16
	F246E	35±4	39±13	52±26	57±1	13±4	-	+/-	-	31±1
	P247E	-1±1	-5±1	0±2	10±6	87±72	+	+	+	65±18
	K249E	120±46	92±46	69±21	89±28	62±29	-	+	+	31±13
	F250E	2±2	-1±0	3±2	19±3	0±5	+	+	+	32±25
S1'	L251E	31±12	34±15	75±43	72±9	123±10	+	+	+	54±9
S1'	D252R	41±12	40±11	74±40	95±9	67±38	-	+	+	46
S1'	F253E	2±1	0±1	5±3	8±2	1±3	-	-	-	15±1
S1'	K254E	97±23	115±17	92±27	99±9	38±10	+	+	+	61
S1'	S261E	25±3	33±13	42±6	122±29	40±8	+	+	+	138
S1'	D263R	22±6	23±9	30±10	66±4	15±16	-	+	+	70±13
	K265E	92±15	75±36	124±35	68±20	59±24	+	+	+	58±20
	F266E	21±19	43±61	18±10	17±7	-4±4	-	-	-	36±9
	P267E	71±9	96±33	97±7	78±27	20±10	+/-	+	+/-	125
	R269E	102±2	123±28	90±22	120±5	72±0	+	+	+	193±86
H1'	E271R	42±9	46±17	31±12	41±9	49	+	+	+	68±23
H1'	L275R	71±25	68±19	117±27	109±7	152	+	+	+	81
	H277E	110±10	114±14	101±21	85±19	11±25	-	+	+	127
	Q278E	36±15	35±9	48±26	74±2	64±9	-	+	+	47
	Q279E	99±23	111±10	98±42	149±5	98±30	+	+	+	90
	F280E	97±10	124±40	98±5	147±101	108±40	+	+	+	102±4
		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	-	-	-	0±0

		c-fos GAL4-E1A	c-fos GAL4-VP16	β-retinoïc AR GAL4-E1A	β-retinoïc AR GAL4-VP16	in vitro Txn	TATA	TBP + TFIIA	TBP + TFIIB	TBP + TFIIA&B	TFIIA column
	spm3	100	100	100	100	100	+	+	+	+	100
S2'	S282E	45±8	51±23	59±12	61±4	72±56	+	+	+	+	102
S2'	Y283E	3±3	6±4	15±5	22±9	4±7	-	-	-	-	16±1
étrier	E284R	5±2	7±5	8±11	-12±3	2±8	+	+	-	+	113±54
étrier	P285E	1±1	5±4	-1±3	0±3	1±0	-	-	-	-	33±22
étrier	E286R	52±15	52±36	61±5	65±33	4±5	+	+	-	+	166
étrier	L287E	11±3	12±5	8±2	19±3	12±13	+	+	-	+	69
	K297E	108±12	120±17	111±30	84±43	58±34	+	+	+	+	66
	R299E	84±6	96±20	113±16	93±1	68±40	-	+	+	+	56
	F305A	52±6	60±22	72±13	28±6	-1±0	-	+/-	-	-	46
	V306E	77±10	99±5	81±6	96±16	71±21	+	+	+	+	144±19
	S307F	27±22	18±9	19±17	62±13	-1±5	-	+/-	-	+/-	36±12
	K316E	29±17	21±8	30±6	42±11	0±11	-	-	-	-	35±8
	V317E	79±11	78±18	72±30	52±30	146±18	+	+	+	+	91
H2'	R318E	93±47	137±32	193±28	267±48	77±121	-	+	+	+	67±14
H2'	A319R	85±16	70±25	100±15	99±11	96±35	+	+	+	+	57
H2'	E320R	40±4	19±21	32±15	30±22	-8±11	-	-	-	-	24±3
H2'	Y322E	58±9	47±15	98±3	121±1	99±3	+	+	+	+	89±62
H2'	E323R	71±10	52±30	80		25±32	+/-	+	+	+	80
H2'	E326A	104±10	100±15	152±2	115±31	64±33	+	+	+	+	64
H2'	N327E	89±18	60±8	95±23	69±6	42±4	+	+	+	+	87
H2'	Y329E	33±10	19±6	32±8	36±30	3±5	-	-	-	-	34±4
H2'	P330R	110±70	67±17	85±24	96±32	9±11	+/-	+	+/-	+	36±27
H2'	K333E	96±24	93±17	100±6	99±22	80±36	+	+	+	+	145
H2'	G334R	131±26	153±61	127±18	102±12	102±8	+	+	+	+	109
	R336E	115±47	114±46	201±48	161±7	114±25	+	+	+	+	157±29
	K337E	39±3	55±21	42±4	84±11	41±14	+	+	+	+	120
	T338R	110±54	97±37	92±4	124±30	104±37	+	+	+	+	110±90
		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	-	-	-	-	0±0

Tableau III_A – Mutagenèse Systématique Des Résidus de la Face Convexe du TBP par O.Bryant & al.–

Dans les deux premières colonnes de droites, sur fond blanc, figure la localisation et la dénomination des mutations effectuées. Les substitutions notées sur fond noir, correspondent aux mutations désorganisant la structure du TBP.

Les quatre colonnes suivantes présentent les pourcentages d'activité de la luciférase 24^H après transfection dans des cellules Cos :

- d'un plasmide rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle d'une boîte TGTA, et non TATA, dans le promoteur c-fos ou dans le promoteur du récepteur β à l'acide rétinoïc et contenant des séquences de liaison à Gal4.

- d'un plasmide codant pour le TBP spm3 portant la substitution indiquée

- d'un plasmide d'expression de la protéine de fusion Gal4-E1A ou Gal4-VP16

L'expression de la luciférase obtenue avec chaque mutant est exprimée par rapport à celle mesurée avec le TBPspm3.

La colonne Txn traduit le taux de transcription basal observé, in vitro, pour chaque mutant dans le système décrit par (Kaufmann et al., 1996).

Les quatre colonnes suivantes énumèrent les résultats de retard sur gel entre TBP et l'ADN huitième colonne ; entre TBP, l'ADN et TFIIA neuvième colonne ; entre TBP, l'ADN et TFIIB dixième colonne et entre TBP, l'ADN, TFIIA & TFIIB onzième colonne. Les +³ indiquent que l'interaction entre ces éléments a lieu avec une mobilité électrophorétique différente de celle observé avec le TBP spm3.

La dernière colonne montre la capacité de chaque mutant à être retenu en chromatographie d'affinité par TFIIAαβ(p55) + γ.

Sur les 75 mutants restants, 13 ne sont pas ou très peu actifs sur les promoteurs modifiés TGTA. Ces mutants portent les substitutions hG175R, hC176R, hA184E, hN189E, hE191R, hR205E, hR231E, hR235E, hR239S, hP247E, hF250E, hE284R, hL287E. Les altérations hA184E, hN189E, hE191R et hR205E se localisent dans le domaine de reconnaissance à TFIIA ce qui explique leur incapacité à initier la transcription. De même les substitutions hE284R & hL287E annihilent l'interaction TBP/TFIIB. Les mutations hR231E, hR235E & hR239S concernent l'hélice α H2 de TBP, élément structural impliqué dans la régulation de la liaison à TFIIA (Buratowski and Zhou, 1992) mais également à TAF1B (Pereira et al., 2003) & a Brf1 (Juo et al., 2003). La faible activation du gène de la luciférase par les mutants hTBP spm3+G175R, hTBP spm3+A184E et hTBP spm3+F250E, pourrait être, quant à elle, due au faible niveau d'expression de ces protéines dans les cellules COS. L'ensemble des données collectées lors de cette étude sont résumées dans le tableau III_1.

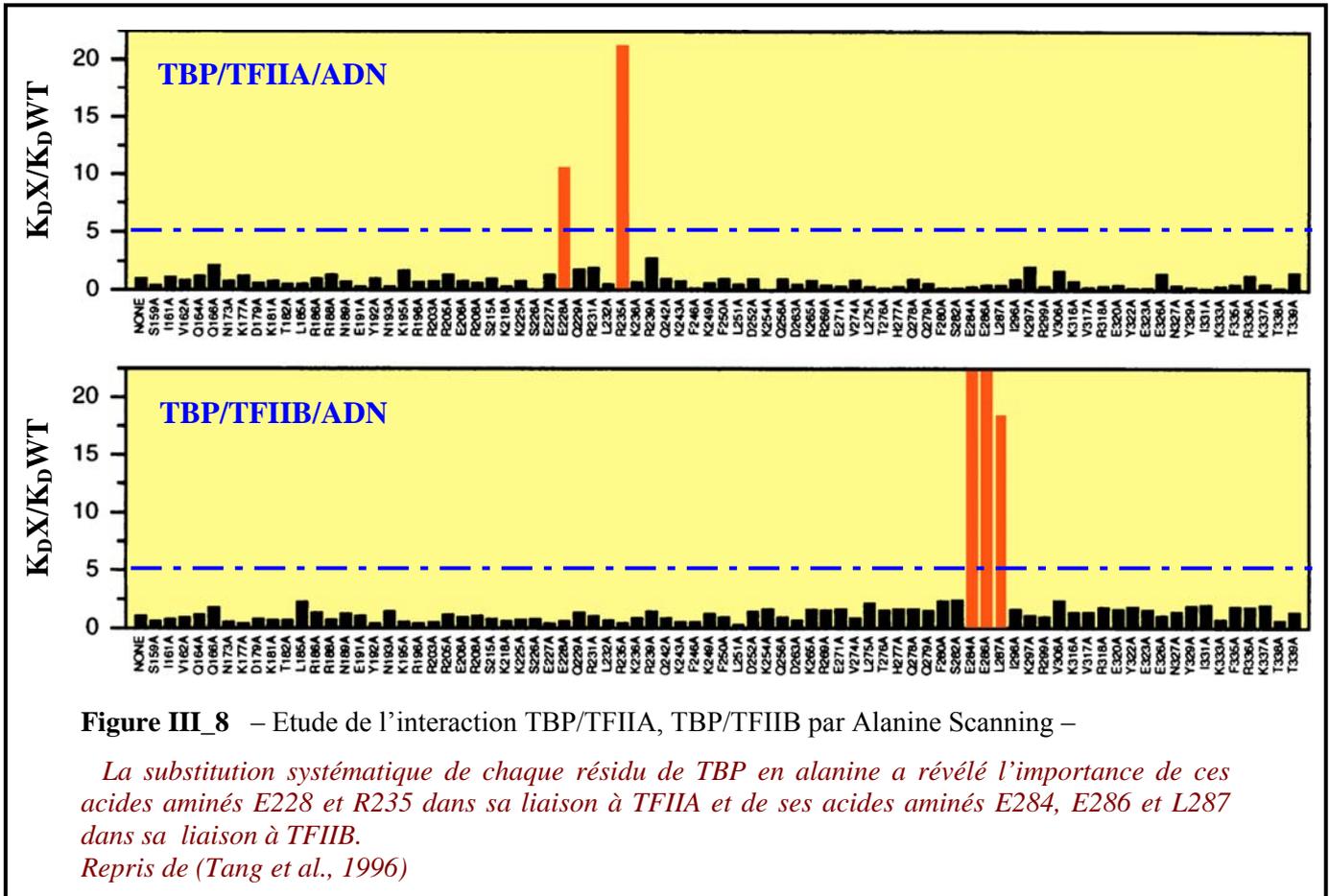
Parallèlement aux travaux du Dr. G.O. BRYANT, une étude de substitution systématique de chaque résidu de TBP en alanine (*alanine scanning*) a été réalisée par l'équipe du Dr. R.H. EBRIGHT (Tang et al., 1996). Dans cette étude seulement deux résidus sont décrits comme critiques pour l'interaction TBP/TFIIA et trois pour l'interaction TBP/TFIIB (*cf. FigIII_8*).

D'après le Dr. H. TANG, les substitutions E228A et R235A des résidus de l'hélice α H2 de TBP entraînent une augmentation de plus de 5 fois du K_D (TBP/TFIIA/ADN) alors que ces résidus sont décrits par M BRYANT comme affectant la liaison de TBP à l'ADN et non la formation du triptyque TBP/TFIIA/ADN. Des procédures expérimentales différentes pourraient être à l'origine de cela. L'équipe du Dr. R.H. EBRIGHT utilise en effet, une fraction d'extrait nucléaire enrichie en TFIIA, alors que l'équipe du Dr. A.J. BERK utilise du TFIIA recombinant.

Les acides aminés E284, E286 et L287 du second étrier de TBP ont été décrits par les deux équipes comme nécessaires à l'interaction TFIIB. Ces résidus lient directement TFIIB comme l'a démontré la structure cristallographique TFIIB/TBP/ADN (Nikolov et al., 1995).

On peut s'étonner du nombre d'acides aminés de TBP que l'*alanine scanning* a révélé comme essentiels aux interactions avec TFIIA ou TFIIB : ce nombre est beaucoup moins important que celui rapporté dans l'étude du Dr. G.O. BRYANT. Une substitution d'un résidu par une alanine abolirait un des contacts entre les deux partenaires alors que les substitutions effectuées par le Dr. G.O. BRYANT et ses collaborateurs déstabiliseraient toute interface de

contact. La substitution N189A, par exemple, n'a que peu d'influence sur les partenaires de TBP alors que la mutation N189E empêche la formation du complexe TBP/TFIIA.



3.8) Les Paralogues de TBP.

Le concept d'universalité de TBP dans l'initiation de la transcription a été remis en cause par la découverte de protéines apparentées à TBP. Jusqu'à présent l'existence de quatre paralogues de TBP (*TRFs* : *TBP Related Factors*) a été rapportée.

3.8.1 TBP Related Factor 1.

TRF1, le premier paralogue de TBP à avoir été caractérisé, présente 60% d'identité avec TBP. Présent uniquement chez la Drosophile, TRF1 est exprimé de façon ubiquitaire aux stades précoces de l'embryogenèse, puis, plus tardivement, de manière spécifique dans les gonades et le système nerveux central (Crowley et al., 1993).

TRF1 partage avec TBP sa capacité à lier l'élément TATA ainsi que TFIIA et TFIIB (Hansen et al., 1997). TRF1 agit comme un facteur de transcription spécifique de la pol.II, pour l'expression d'un sous-ensemble de gènes dont Tudor (Holmes and Tjian, 2000). TRF1 dirige la transcription de Tudor à partir d'un site d'initiation riche en oligonucléotides TC et ce malgré la présence d'une boîte TATA reconnue par TFIID. Il semble que la faculté de TRF1 à reconnaître un élément du promoteur ne dépende pas totalement des caractéristiques intrinsèques de cette protéine, mais, serait influencée par des facteurs qui lui sont associés (Hochheimer and Tjian, 2003).

Des immunomarquages dirigés contre TRF1 sur les chromosomes polytènes de *Drosophile*, ont montré que TRF1 ne se focalise pas uniquement sur des gènes impliqués dans la fertilité mâle ou dans des mécanismes neuraux mais aussi sur les gènes de l'ARN 5S et de certains ARNt (Hansen et al., 1997). Par la suite il a été montré que TRF1 et Brf1 co-localisent et co-précipitent. L'immunodéplétion du TBP d'extraits embryonnaires de *Drosophile* n'a que peu d'effet sur la transcription par la pol.III alors que la délétion de Brf1 ou TRF1, l'arrête. Il s'est avéré que le complexe TRF1/Brf1 est plus stable que le complexe TBP/Brf1 (Takada et al., 2000). Étonnamment, ces données montrent que chez la *Drosophile* TRF1, plutôt que TBP, joue un rôle majeur dans la transcription par la pol.III.

3.8.2 TBP Related Factor 2.

Le second paralogue de TBP, TRF2, a été initialement découvert dans la lignée humaine HeLa, lors de la caractérisation du complexe TFTC (*TFTC : TBP Free TAFs Complex*) (Wieczorek et al., 1998). Bien qu'il ait été montré par la suite que TRF2 n'est pas présent dans TFTC, le travail du Dr. E. WIECZOREK a initié la recherche d'orthologues de TRF2. Finalement, TRF2 est présent chez tous les métazoaires. Chez l'humain, TRF2 présente 60% de similarité dont 40% d'identité avec TBP et conserve les sites d'interaction avec TFIIA et TFIIB. En revanche, TRF2 ne fixe pas les éléments TATA, aucune séquence de fixation de TRF2 à l'ADN n'est connue à ce jour.

La fonction de TRF2 a été étudiée *in vivo* chez *C. elegans*, *X. laevis* et *D. rerio*. Dans ces trois organismes, TRF2 est nécessaire à l'expression d'un sous-ensemble de gènes lors du démarrage de la transcription zygotique, l'inactivation de TRF2 provoquant la mort au stade embryonnaire (Dantonel et al., 2000; Kaltenbach et al., 2000; Muller et al., 2001; Veenstra et al., 2000).

TRF2 est également essentiel à l'embryogenèse de la Drosophile puisqu'il intervient dans la progression du cycle cellulaire. La purification du TRF2 endogène à partir d'extraits d'embryons a démontré sa présence dans un complexe multiprotéique (Hochheimer et al., 2002). Ce complexe contient des facteurs de remodelage de la chromatine, par exemple la sous-unité catalytique ATPase, IWSI, ainsi que DREF (*DREF : DNA replication-related element binding factor*). DREF est une protéine se liant aux éléments DRE présents dans des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. En se fixant sur les promoteurs de ces gènes par l'intermédiaire de DREF, TRF2 contrôle donc la prolifération.

L'inactivation de TRF2 dans les cellules lymphoïdes DT40 de Poulet a révélé une autre fonction de TRF2 dans le cycle cellulaire (Shimada et al., 2003). Dans ces cellules, TRF2 passe du cytoplasme au noyau uniquement lors de la phase G2 du cycle cellulaire ou après exposition aux ultraviolets ou au méthyl-méthane-sulfonate. Par conséquent, les cellules *trf2*^{-/-} ont une phase G2 raccourcie et une sensibilité moindre à ces stress.

Chez les mammifères, TRF2 a une fonction beaucoup plus spécialisée. Chez la Souris, TRF2 est très fortement exprimée dans les cellules méiotiques au stade pachytène et dans les spermatides ronds haploïdes. Les souris *trf2*^{-/-} sont viables, TRF2 n'est donc pas essentiel à l'embryogenèse murine (Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Les souris *trf2*^{-/-} femelles sont fertiles mais les mâles sont stériles à cause d'une absence totale de spermatozoïdes matures. La spermiogenèse est interrompue par l'apoptose tardive des spermatides ronds. Ces spermatides sont caractérisés par une désorganisation de leur hétérochromatine avec une fragmentation du chromocentre (Martianov et al., 2002a).

La majorité des études concernant TRF2 montrent donc qu'il pourrait avoir un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et la réponse à certains stress.

Figure III_9

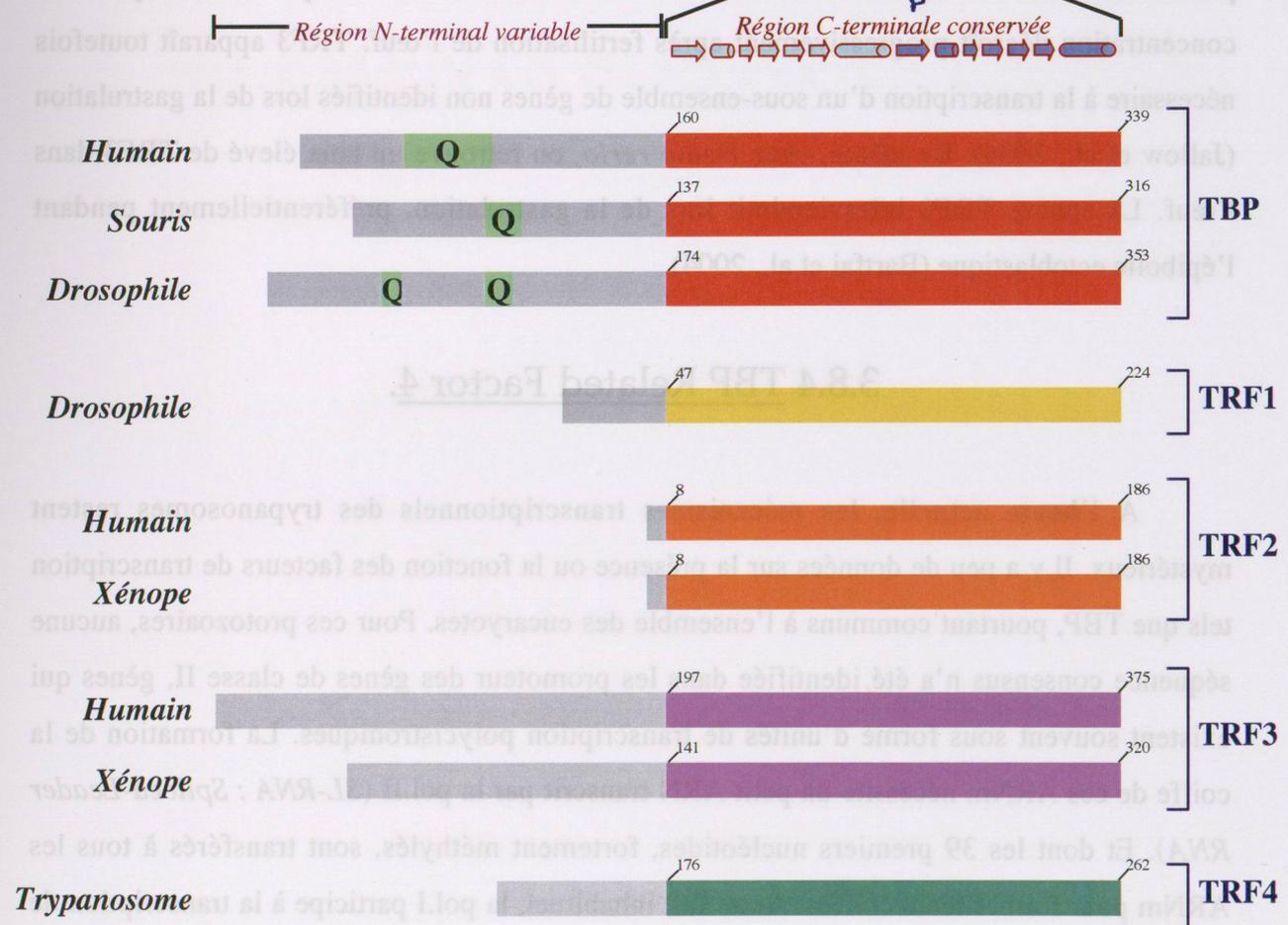
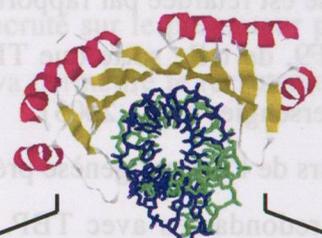
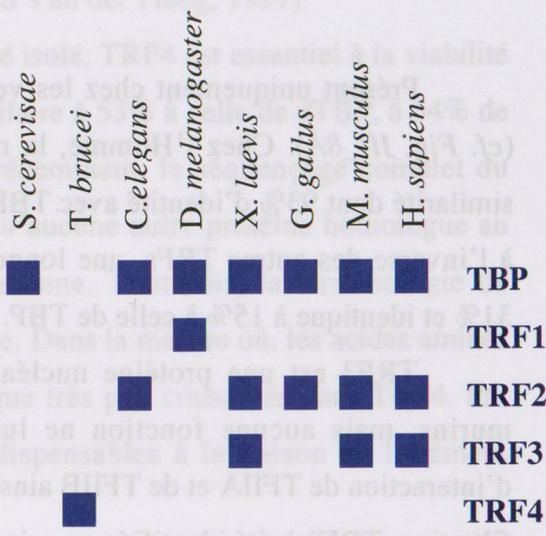
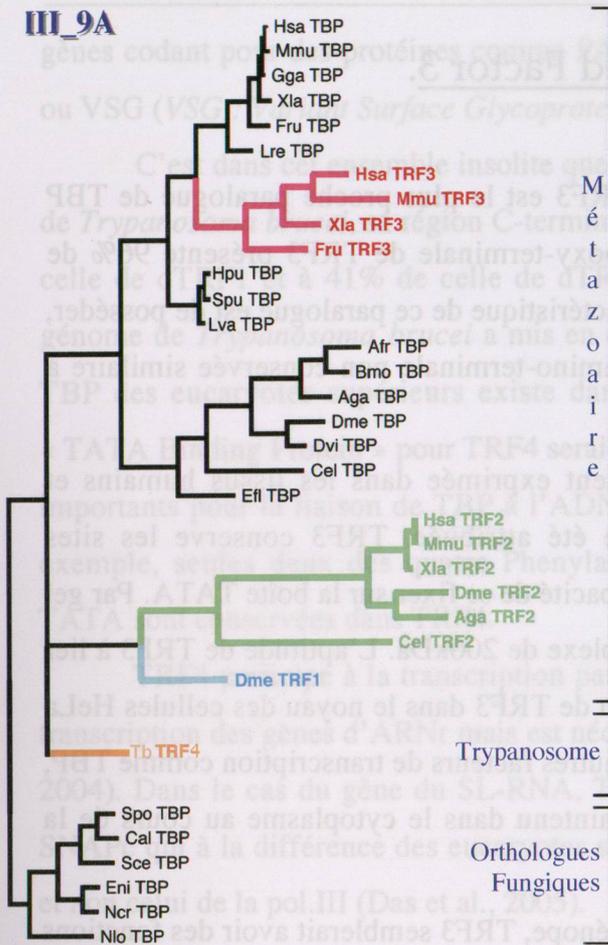
– TBP et ses Paralogues –

A *Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre orthologues et paralogues de TBP. d'après (Persengiev et al., 2003)*

B *Répartition de TBP et des TRFs dans les principales espèces modèles étudiées en biologie.*

C *Représentation schématique de la séquence protéique de TBP par rapport à ses paralogues dans diverses espèces. La forte similarité qui existe entre les extrémités C-terminales de ces protéines laisse supposer que ces régions adoptent des structures tertiaires très proches.*

Abréviations taxonomiques : Afr, Arteria franciscana - Aga, Anopheles gambiae - Bmo, Bombyx mori - Cal, Candida albicans - Cel, Caenorhabditis - Dme, Drosophila melanogaster - Dvi, Drosophila virilis - Efl, Ephydatia fluviatilis - Eni, Emericalla nibulans - Fru, Fugu rubripes - Gga, Gallus gallus - Hpu, Hemicentrotus pulcherrimus - Hsa, Homo sapiens, Lre Lampetra reissneri - Lva, Lytechinus variegatus - Mmu, Mus musculus - Ncr, Neurospora crassa - Nlo, Nosema locustae - Sce, Saccharomyces cerevisiae - Spo, Schizosaccharomyces pombe - Spu, Strongylocentrotus - Tb, Trypanosoma brucei - Xla, Xenopus laevis.



3.8.3 TBP Related Factor 3.

Présent uniquement chez les vertébrés, TRF3 est le plus proche paralogue de TBP (cf. Fig. III_8A). Chez l'Homme, la région carboxy-terminale de TRF3 présente 96% de similarité dont 93% d'identité avec TBP. Une caractéristique de ce paralogue est de posséder, à l'inverse des autres TRFs, une longue région amino-terminale non conservée similaire à 31% et identique à 15% à celle de TBP.

TRF3 est une protéine nucléaire largement exprimée dans les tissus humains et murins, mais aucune fonction ne lui a encore été attribuée. TRF3 conserve les sites d'interaction de TFIIA et de TFIIB ainsi que la capacité de se fixer sur la boîte TATA. Par gel filtration, TRF3 a été identifiée au sein d'un complexe de 200kDa. L'aptitude de TRF3 à lier des TAFs reste encore à prouver. La relocalisation de TRF3 dans le noyau des cellules HeLa en fin de mitose est retardée par rapport à celle d'autres facteurs de transcription comme TBP, TFIIB ou TAF9, de telle sorte que TRF3 est maintenu dans le cytoplasme au cours de la cytotodérèse (Persengiev et al., 2003).

Au cours de l'embryogenèse précoce du Xénope, TRF3 semblerait avoir des fonctions partiellement redondantes avec TBP. TRF3 est abondant dans l'oocyte de Xénope et sa concentration décroît progressivement après fertilisation de l'œuf. TRF3 apparaît toutefois nécessaire à la transcription d'un sous-ensemble de gènes non identifiés lors de la gastrulation (Jallow et al., 2004). De même, chez *Danio rerio*, on retrouve un taux élevé de TRF3 dans l'œuf. Là encore TRF3 interviendrait lors de la gastrulation, préférentiellement pendant l'épibolie ectoblastique (Bartfai et al., 2004).

3.8.4 TBP Related Factor 4.

A l'heure actuelle, les mécanismes transcriptionnels des trypanosomes restent mystérieux. Il y a peu de données sur la présence ou la fonction des facteurs de transcription tels que TBP, pourtant communs à l'ensemble des eucaryotes. Pour ces protozoaires, aucune séquence consensus n'a été identifiée dans les promoteur des gènes de classe II, gènes qui existent souvent sous forme d'unités de transcription polycistroniques. La formation de la coiffe de ces ARNm nécessite un petit ARN transcrit par la pol.II (*SL-RNA* : *Spliced-Leader RNA*). Et dont les 39 premiers nucléotides, fortement méthylés, sont transférés à tous les ARNm pour former leurs coiffes. Autre fait inhabituel, la pol.I participe à la transcription de

gènes codant pour des protéines comme PARP (*PARP : Procylic Acidic Repetitive Protein*) ou VSG (*VSG : Variant Surface Glycoprotein*) (Lee and Van der Ploeg, 1997).

C'est dans cet ensemble insolite que TRF4 a été isolé. TRF4 est essentiel à la viabilité de *Trypanosoma brucei*, sa région C-terminale est similaire à 53% à celle de dTBP, à 54% de celle de dTRF1 et à 41% de celle de dTRF2. Très récemment, le séquençage complet du génome de *Trypanosoma brucei* a mis en évidence qu'aucune autre protéine homologue au TBP des eucaryotes supérieurs existe dans cet organisme. Toutefois, la terminologie de « TATA Binding Protein » pour TRF4 serait maladroite. Dans la mesure où, les acides aminés importants pour la liaison de TBP à l'ADN ne sont que très peu conservés dans TRF4. Par exemple, seules deux des quatre Phenylalanines indispensables à la liaison de l'élément TATA sont conservées dans TRF4.

TRF4 participe à la transcription par les pol.I, II et III. TRF4 n'est pas requis pour la transcription des gènes d'ARNr mais est nécessaire à l'expression du gène PARP (Ruan et al., 2004). Dans le cas du gène du SL-RNA, TRF4 est recruté sur le promoteur par l'ensemble SNAPc qui à la différence des eucaryotes supérieurs va permettre le recrutement de la pol.II et non celui de la pol.III (Das et al., 2005).

IV

PRÉSENTATION SUCCINCTE

des

ÉLÉMENTS SUB-NUCLÉAIRES

IV PRESENTATION SUCCINCTE des ÉLEMENTS SUB-NUCLEAIRES

Bien que le noyau des cellules eucaryotes ait été l'une des premières structures intracellulaires identifiées en microscopie, son fonctionnement reste néanmoins encore largement incompris. S'il est apparu, ces dernières années, que le noyau cellulaire possède une structure extrêmement malléable, il reste néanmoins fractionné en sous-structures aux fonctions hautement spécialisées.

4.1) Structure Générale du Noyau Interphasique des Eucaryotes.

Le noyau des eucaryotes supérieurs est constitué d'une superposition de deux réseaux dont les interactions l'un avec l'autre demeurent largement obscures et sous évaluées. Le réseau constitué par la matrice nucléaire interagit en effet étroitement avec le réseau chromatinien porteur de l'information génétique, allant jusqu'à diriger des mécanismes aussi essentiels que la transcription, la réplication et la maturation des ARN messagers (Shumaker et al., 2003).

4.1.1 - L'Enveloppe Nucléaire.

L'une des différences fondamentales entre eucaryotes et procaryotes est la présence d'une enveloppe nucléaire qui sépare le compartiment cytoplasmique du compartiment nucléaire. L'organisation de l'enveloppe nucléaire est complexe (Gerace and Burke, 1988). Elle est formée d'une membrane externe et d'une membrane interne définissant un espace périnucléaire (*cf. Fig.IV_1*). La membrane externe et le réticulum endoplasmique rugueux forment un continuum. La lumière du réticulum endoplasmique rugueux prolonge quant à elle l'espace périnucléaire. La membrane interne de l'enveloppe nucléaire est fortement associée à un réseau filamentueux multiprotéique : la lamina (*voir plus bas*) et à l'hétérochromatine

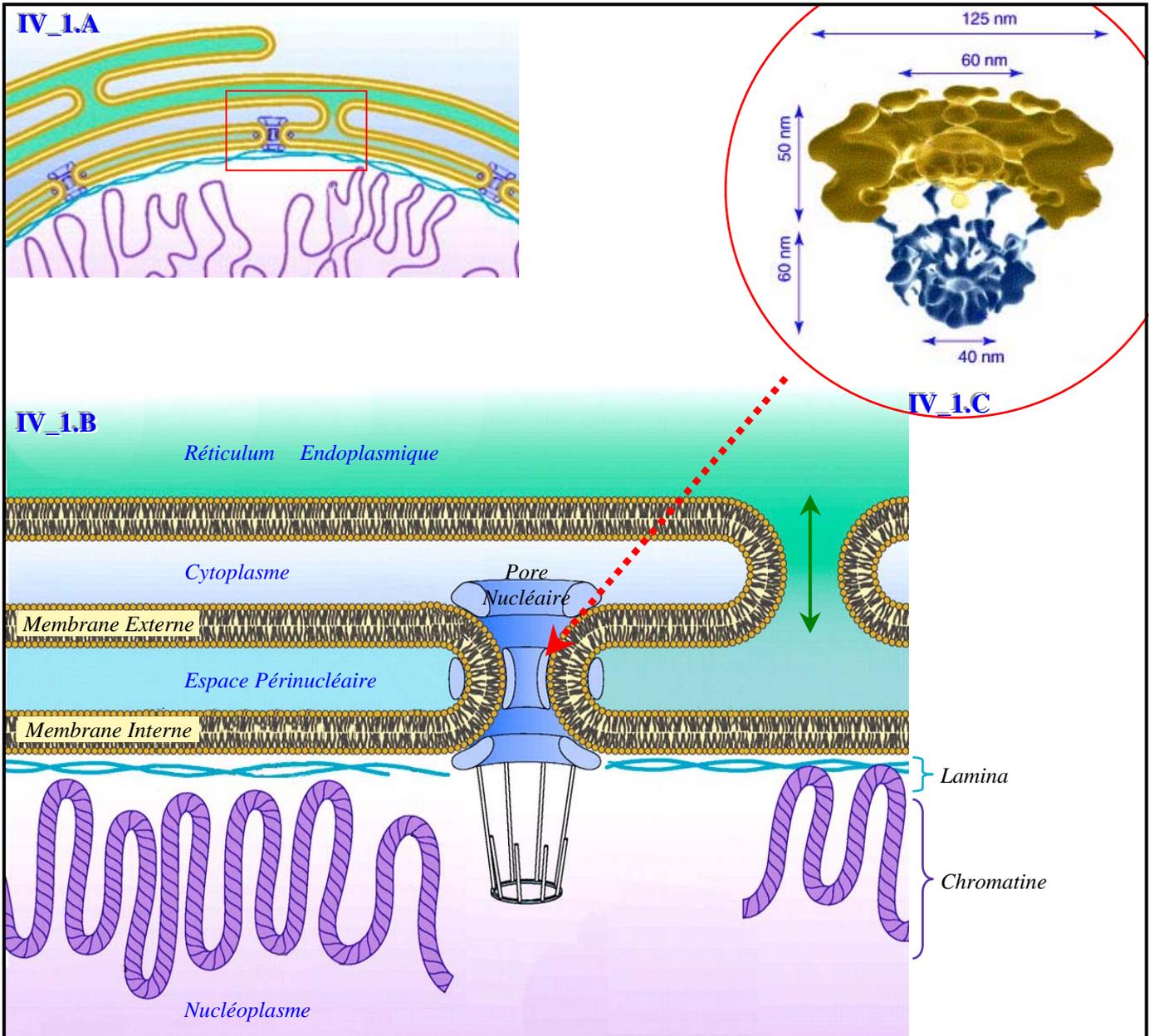


Figure IV_1 - L'Interphase Cytoplasme/Nucléoplasme -

A Représentation schématique d'une coupe médiane de l'enveloppe nucléaire avec la partie, cytoplasmique au dessus, séparé de l'environnement nucléaire en dessous (violet) par une double bicouche lipidique (jaune).

B L'agrandissement du schéma 1A montre la chromatine qui vient s'amarrer sous la membrane nucléaire interne au niveau de la lamina. L'espace périnucléaire est en continuité directe avec la lumière du réticulum endoplasmique (flèche verte), inspiré d'après (Muchir and Worman, 2004).

C En médaillon, coupe médiane du pore nucléaire tel qu'il apparaît en cryo-électro-microscopie avec une résolution de 8-9nm. Côté cytoplasmique en bleu, côté nucléaire en jaune, adapté d'après Beck et al., 2004.

périphérique. Les membranes interne et externe se rejoignent ponctuellement au niveau des pores nucléaires qui sont des assemblages macromoléculaires de plus de 120MDa, composés eux-mêmes d'une trentaine de protéines différentes (Beck et al., 2004; Schwartz, 2005) qui permettent de réguler le flux nucléo-cytoplasmique.

4.1.2 - Ultra-Structure de la Matrice Nucléaire ou Caryosquelette.

La matrice nucléaire est composée, d'une part, par la lamina immédiatement située sous la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et d'autre part, d'un maillage nucléaire interne qui se déploie à partir de la lamina pour parcourir tout le noyau. (*cf. Fig.IV_2A & B*).

La lamina est un élément primordial de l'enveloppe nucléaire, elle est à la fois associée à la face nucléaire de la membrane nucléaire interne, aux pores nucléaires et à l'hétérochromatine périphérique. La lamina est constituée principalement de lamines. Apparentées aux filaments intermédiaires de type-V du cytosquelette, les lamines sont majoritairement subdivisées en quatre types, les lamines A et C, codées par le gène *LMNA*, les lamines B1 codées par le gène *LMNB1* et les lamines B2 codées par le gène *LMNB2*. Chez le Xénope, des expériences de microscopie électronique ont pu mettre en évidence que la lamina résulte d'un assemblage de filaments de lamines de 10nm à l'instar des filaments intermédiaires du cytoplasme (Aebi et al., 1986), ceci n'a pu être mis en évidence pour d'autres espèces.

L'ultra-structure du maillage nucléaire interne est un réseau granulaire fibreux de nature ribo-nucléoprotéique (*cf. Fig.IV_2C & D ci-après*) qui se présente en microscopie électronique comme un enchevêtrement de filaments de 10nm de diamètre, fréquemment ramifié recouvert de particules ribonucléoprotéiques (He et al., 1990). Des expériences d'électrophorèse en 2 dimensions ont montré que ce réseau granulaire fibreux est formé par plus de 200 protéines différentes (Fey et al., 1986; Mattern et al., 1996) dont certaines sont spécifiques aux types cellulaires (Fey and Penman, 1988) ou à l'étape de développement de la cellule (Dworetzky et al., 1990). Malgré ce grand nombre de données biochimiques sur le maillage nucléaire interne, la nature des filaments qui le composent, la manière dont ils s'assemblent, ainsi que leur mode de ramification, restent énigmatiques.

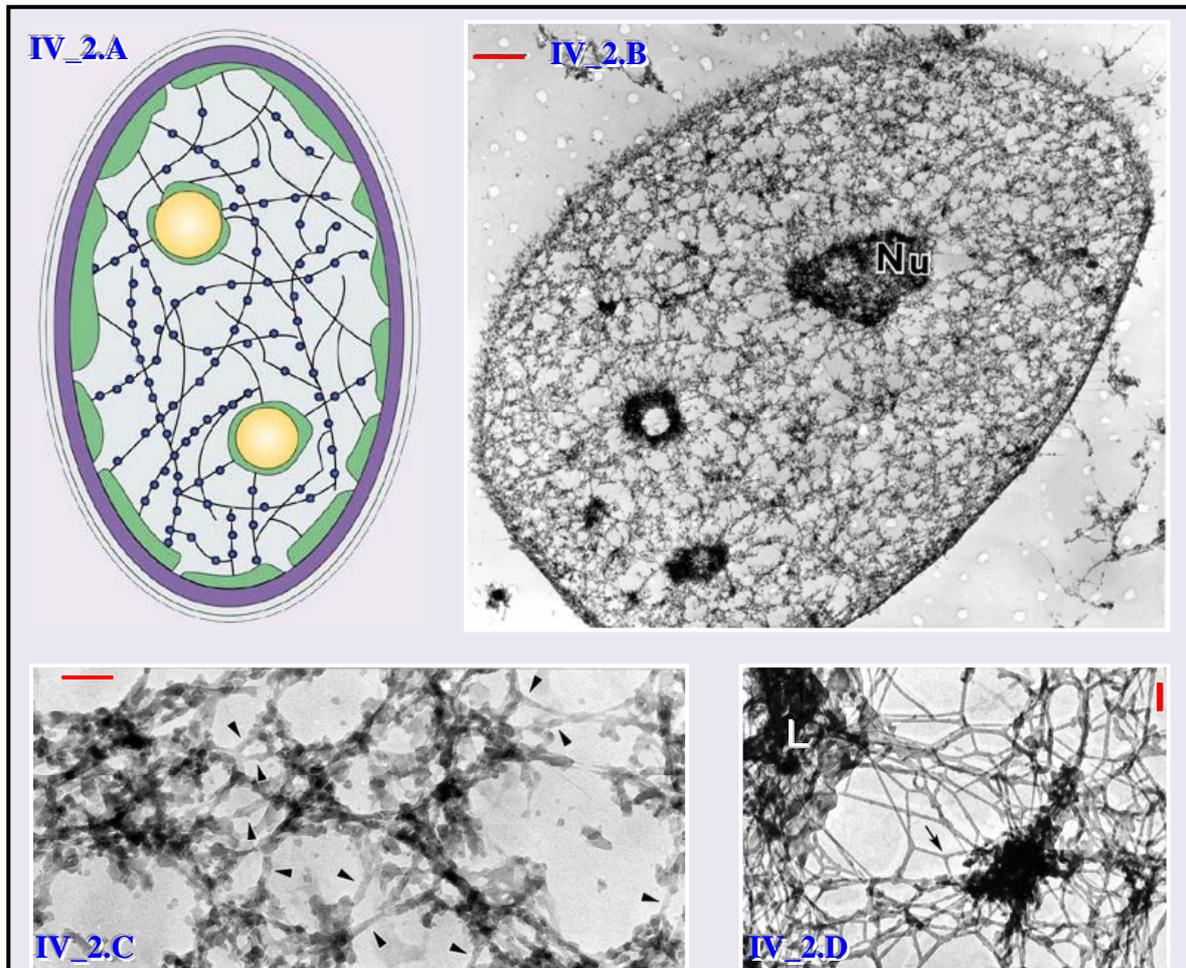


Figure IV_2 - La Matrice Nucléaire Interne -

A Schéma d'une cellule en interphase, la lamina est représentée en violet, les nucléoles en jaunes et l'hétérochromatine en vert. Le maillage nucléaire interne parcourt l'intérieur du noyau en se ramifiant fréquemment (fine ligne noire) les particules ribonucléoprotéiques associées au maillage nucléaire interne sont représentées par des points bleus. Adapté d'après (Zink et al., 2004)

B Image au microscope électronique de la matrice nucléaire interne.

C Matrice nucléaire interne à plus fort grossissement, on distingue les filaments de 10 nm de diamètre (têtes de flèche) et les particules ribonucléoprotéiques

D Même préparation que **C** sans étape de fixation et avec une extraction des protéines plus vigoureuse. Les filaments de 10nm apparaissent alors nus sans leur manteau de particules ribonucléoprotéiques. Une ramification typique de ces filaments est marquée d'une flèche.

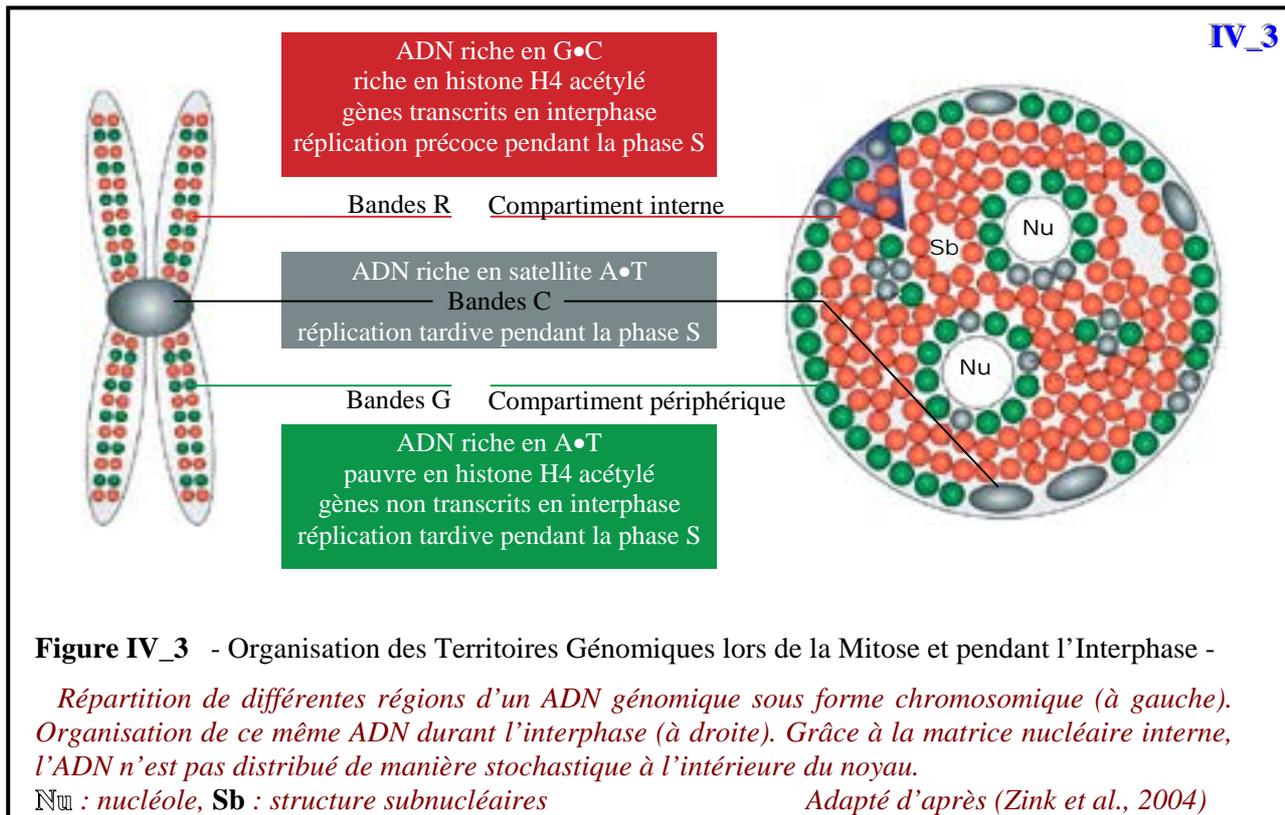
B, C & D proviennent de (Nickerson, 2001)

Nu : nucléole, L : lamina, la barre rouge représente pour **B** : 1µm, **C & D** : 100nm.

4.1.3 - Fonction du Caryosquelette.

Au-delà de son rôle manifeste dans l'organisation structurale du noyau, le caryosquelette est également impliqué dans l'agencement de la chromatine. La chromatine au

sein du noyau se présente en effet, sous forme d'une juxtaposition de boucles (Vogelstein et al., 1980) ; elle est régulièrement attachée à la matrice nucléaire au niveau de séquences d'ADN généralement riche en AT, appelé région d'attachement à la matrice (*Matrix Attachment Region* :MARs). La chromatine ainsi liée à la matrice nucléaire est ordonnée de telle sorte que les domaines G et C des chromosomes se trouvent en périphérie du noyau et des nucléoles et forme l'hétérochromatine (cf. Fig.IV_3 ci-dessous), alors que le domaine R est réparti dans l'ensemble du noyau et constitue l'euchromatine (Sadoni et al., 1999).



Différentes études montrent que les lamines sont impliquées dans l'assemblage de charpentes nucléoplasmiques supportant la réplication de l'ADN. L'immunodéplétion de la Lamine B3 (Meier et al., 1991; Newport et al., 1990) ou la déstructuration des réseaux de lamine A (Spann et al., 1997) dans les œufs de Xénope réduit, en effet, significativement toute néosynthèse de l'ADN. Dans les cellules NIH3T3 les lamines B sont colocalisées aussi avec PCNA au niveau des fourches de réplication au milieu et à la fin de la phase S (Moir et al., 1994). Il a également été observé dans les cellules WI38 une association entre les fourches de réplication et les lamines A (Kennedy et al., 2000).

Le fait d'avoir découvert que la composition de la lamina changeait en fonction de l'état de développement de l'œuf chez le Xénope (Stick and Hausen, 1985) laissait entrevoir

une implication des lamines dans la transcription. Par la suite, des descriptions d'interactions entre les lamines A, C et le facteur de transcription Rbp (Mancini et al., 1994; Ozaki et al., 1994) ou entre la lamine B1 et le facteur de transcription mGCL (Nili et al., 2001) sont venues conforter cette hypothèse. Somme toute, il a été constaté qu'une altération de l'organisation des lamines inhibe, chez le Xénope et dans des cellules de mammifère, la transcription par l'ARN polymérase II et non par l'ARN polymérase I et III (Spann et al., 2002). Ces mêmes cellules présentent une totale désorganisation des facteurs d'épissage de l'ARN pré-messager, présageant une connivence entre la matrice nucléaire et la machinerie d'épissage.

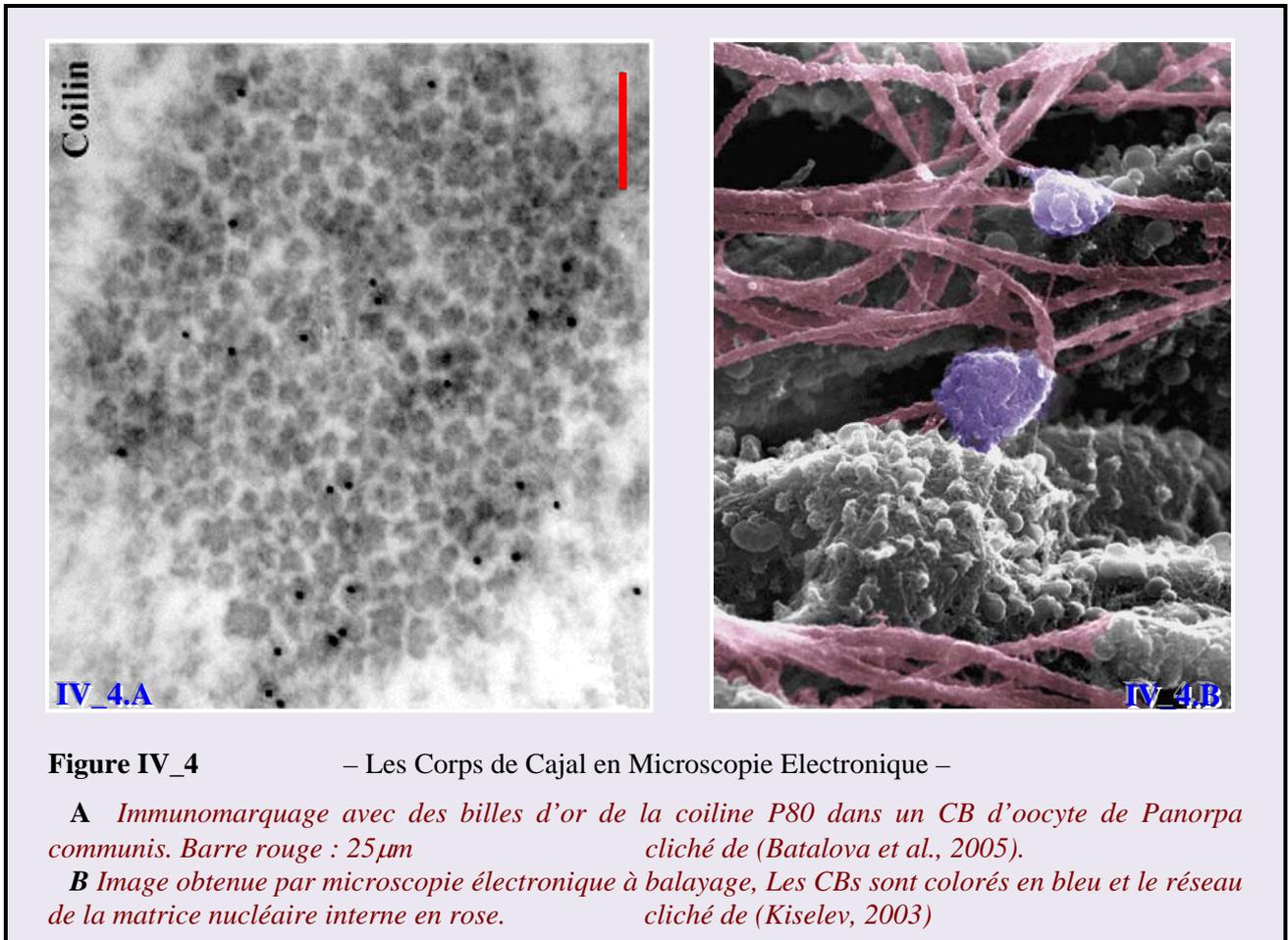
4.2) Principaux Corpuscules Nucléaires.

Les activités majeures du noyau, la transcription, la réplication et l'épissage des ARN pré-messagers, font l'objet d'études fonctionnelles intensives. Malgré tout, très peu de données permettent de comprendre comment ces processus sont intégrés spatialement et temporellement dans la structure tridimensionnelle de la matrice nucléaire. Il devient pourtant évident que le noyau contient différents compartiments extrêmement dynamiques qui régulent ces activités physiologiques.

4.2.1 - Les Corps de Cajal.

Initialement décrit en 1903 par Santiago Ramon y Cajal (Ramón y Cajal, 1903) comme des « corps nucléolaires accessoires », les corps de Cajal (CBs : *Cajal Bodies*) se présentent en microscopie électronique comme des structures très dynamiques (Platani et al., 2000) multilamellaires de 0,1 à 2µm de diamètre (Brasch and Ochs, 1992). Les CBs sont présents chez de nombreuses espèces mais pas dans tous les types cellulaires. Ces corps contiennent de nombreux facteurs de transcription dont TBP, TFIIH et TFIIIF, les polymérases I et II, mais également des protéines nucléolaires tels que la fibrillarine, Nopp140 et B23 (cf. §IV.2.5 *Le Nucléole*) et des facteurs d'épissage comme les petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (*snRNPs* : *small nuclear RiboNucleoprotein Particles*) U3, U7, U8 et U14. Les CBs renferment aussi des protéines qui leur sont spécifiques comme la coiline p80 (Ogg and Lamond, 2002), (cf. *FigIV_4 ci-après*).

Les CBs semble être impliqués dans le métabolisme post-transcriptionnel des ARNs. Même s'ils ne contiennent pas l'ensemble des éléments nécessaires à l'épissage des ARNs, les CBs seraient impliqués dans l'assemblage d'une machinerie de pré-épissage et/ou de



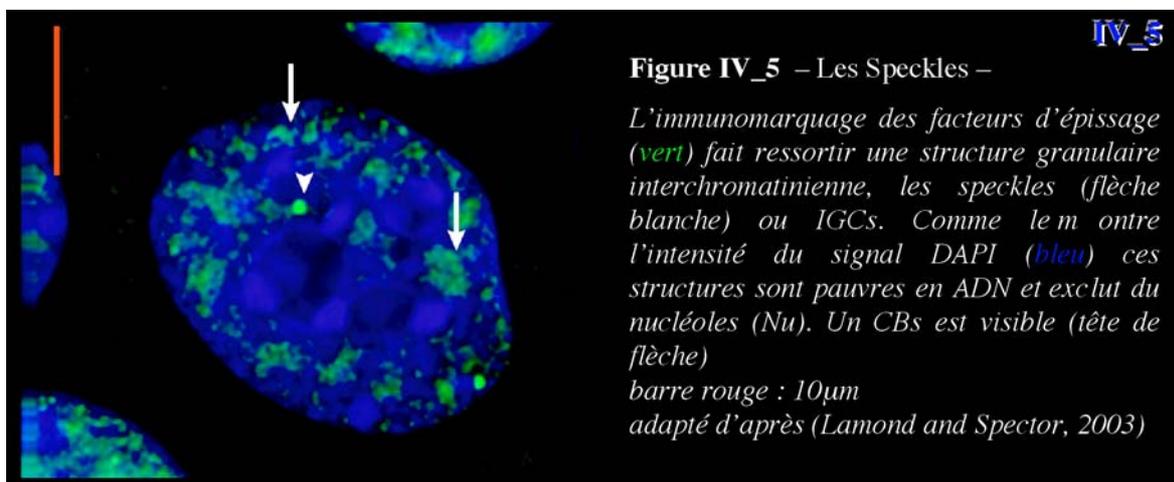
stockage des petits ARN nucléaire (*snRNA*). Les CBs pourraient également être des compartiments dans lesquels les snRNPs seraient maturés pour ensuite être délivrés dans le nucléole (Zimber et al., 2004).

4.2.2 – Les Corps Jumeaux des Corps de Cajal.

Les Corps jumeaux des corps de Cajal (*Gems: Gemini of Cajal bodies*) sont généralement adjacents aux corps de Cajal. Ils pourraient participer avec ces derniers au processus de maturation des snRNPs (Paushkin et al., 2002), comme le laisse supposer leur forte concentration en protéines de survivance des motoneurones (SMNp) et de ses facteurs associés, les Gémins 2-7 (Gubitzi et al., 2004).

4.2.3 - Les Amas Granulaires Interchromatiniens.

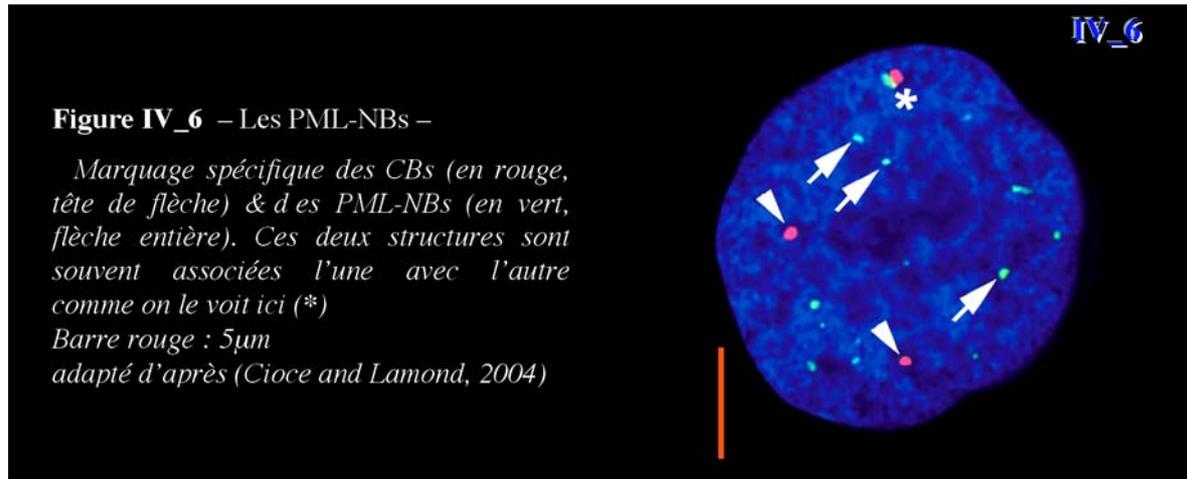
Les CBs ne sont pas les seuls éléments du noyau eucaryote riches en facteurs d'épissage (cf. Fig.IV_5 ci-dessous). Observés la première fois en 1959 par Hewson Swift (Swift, 1959), les amas granulaires interchromatiniens (*speckles* ou *IGCs* : *Interchromatin Granule Clusters*) renferment une concentration en facteur d'épissage 5 à 10 fois supérieure à celle du nucléoplasme (Lamond and Spector, 2003). Les IGCs sont des structures de plusieurs micromètres composées de granules de 20 à 25nm interconnectées entre elles par une fine fibre à l'image d'un collier de perles (Thiry, 1995). Les IGCs sont fortement localisés au niveau des sites à haute activité transcriptionnelle. Les rôles principaux des IGCs sont l'assemblage et l'emmagasinage du complexe d'épissage (Dundr and Misteli, 2001). Une étude récente a toutefois mis en évidence que les interactions entre les IGCs et les ARNs poly-adénylés sont extrêmement dynamiques (Molenaar et al., 2004), démontrant une nouvelle fois que, si les structures subnucléaires sont morphologiquement très bien caractérisées, le paradigme décrivant leurs fonctions reste fragile.



4.2.4 - Les Corps Leucémiques Promyélocyaires.

Initialement caractérisés chez des patients atteints de leucémie promyélocytaire (APL : *Acute Promyelocytic Leukemia*), les corps leucémiques promyélocyaires (PML-NBs : *ProMyelocytic Leukaemia-Nuclear Bodies*), également connus sous le nom de

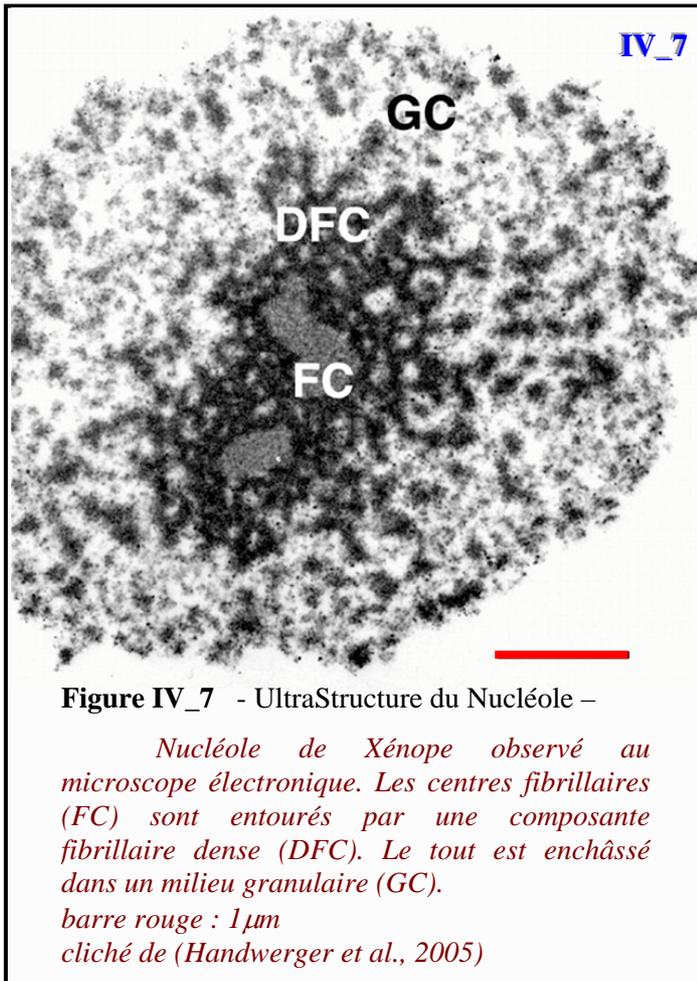
domaine nucléaire 10 ou corps de Kremmer, sont des substructures dynamiques de 0,3 à 1 μ m de diamètre (Maul et al., 2000) (cf. Fig IV_6). Chez les patients souffrant d'APL, la protéine leucémique promyélocitaire (*PMLp*) est fusionnée avec le récepteur à l'acide rétinoïque α (*RAR α*) suite à la translocation chromosomique t(15 ;17)q(22 ;21) (Kakizuka et al., 1991). Les PML-NBs de ces malades sont fragmentés et disséminés dans l'ensemble du nucléoplasme, ce qui souligne l'importance des structures subnucléaires dans les atteintes humaines.



Les PML-NBs paraissent être impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Ruggiero et al., 2000), le stockage de protéines virales et nucléaires (Maul, 1998), ainsi que dans l'apoptose (Quignon et al., 1998). Il a également été remarqué que des cellules HeLa traitées avec de l'interféron- γ présentent une forte accumulation de l'activateur de l'immunoprotéasome : PA28, au niveau de PML-NBs (Fabunmi et al., 2001), suggérant que les PML-NBs pourraient être des centres nucléaires de protéolyse.

4.2.5 – Le Nucléole.

Découvert il y a plus de 150 ans, le nucléole est une structure nucléaire proéminente, facilement observable en microscopie optique à contraste de phase. Le nucléole est le siège de production des ARNs ribosomiques (ARNr) 28S, 18S et 5,8S par la pol.I (cf §III.2 *TBP dans la Transcription des Gènes de Classe I*). Le nucléole est également le centre d'assemblage des sous-unités 40S & 60S ribosomiques à partir des ARNr et de protéines ribosomiques codées par des gènes de classe II.



La microscopie électronique a montré que le nucléole est compartimenté en trois régions (cf. Fig.IV_7). Des centres fibrillaires (FCs : *Fibrillar Centers* :) de 0,1 à 1µm de diamètre, peu denses aux électrons, sont entourés d'un composant fibrillaire dense (DFC : *Dense Fibrillar Components*). Ces corpuscules sont insérés dans un composant granulaire (GC : *Granular Components*) constitué de granules de 15 à 20nm de diamètre (Shaw and Jordan, 1995).

Les nucléoles contiennent les gènes ribosomiques (ADNr). Dans le génome des eucaryotes, ces gènes adoptent une structure en tandem, c'est-à-dire qu'ils sont répétés un grand

nombre de fois les uns à la suite des autres et dans le même sens de lecture. Ces exemplaires de gènes ribosomiques, environ 540 dans les cellules HeLa, sont regroupés sur différents chromosomes (cinq en tout chez l'Homme), définissant ainsi des régions organisatrices du nucléole (NORs : *Nucleolar Organizer Regions*). Les NORs constituent la base organisationnelle du nucléole, dans les noyaux interphasiques, ils se situent en périphérie des FCs. Ce sont les NORs qui vont diriger la reconstruction du nucléole en sortie de mitose, lors de l'anaphase tardive.

Pendant la mitose, les nucléoles sont désassemblés dès le début de la prophase. La pol.I est alors inactivée suite à la phosphorylation de SL1 par le complexe kinase CDK1-cyclineB (Kuhn et al., 1998). La pol.I, tout comme UBF, SL1, TTF1, reste toutefois associée aux gènes ribosomiques pendant la mitose (Roussel et al., 1996), à l'inverse des machineries de maturation qui quittent les NORs en fin de prophase pour les régions périphériques des chromosomes (Hernandez-Verdun and Gautier, 1994). La dégradation de la cyclineB en fin d'anaphase permet la reprise de la transcription par la pol.I. Les machineries de maturation

des ARNr ainsi que les pré-ARNr maternels partiellement maturés se reconcentrent au niveau des NORs et forment des corps pré-nucléolaire (PNBs : *PreNucleolar Bodies*). Les nucléoles pleinement fonctionnels réapparaissent suite à la fusion des PNBs et au recrutement de l'ensemble des composants nucléolaires (Dundr et al., 2000).

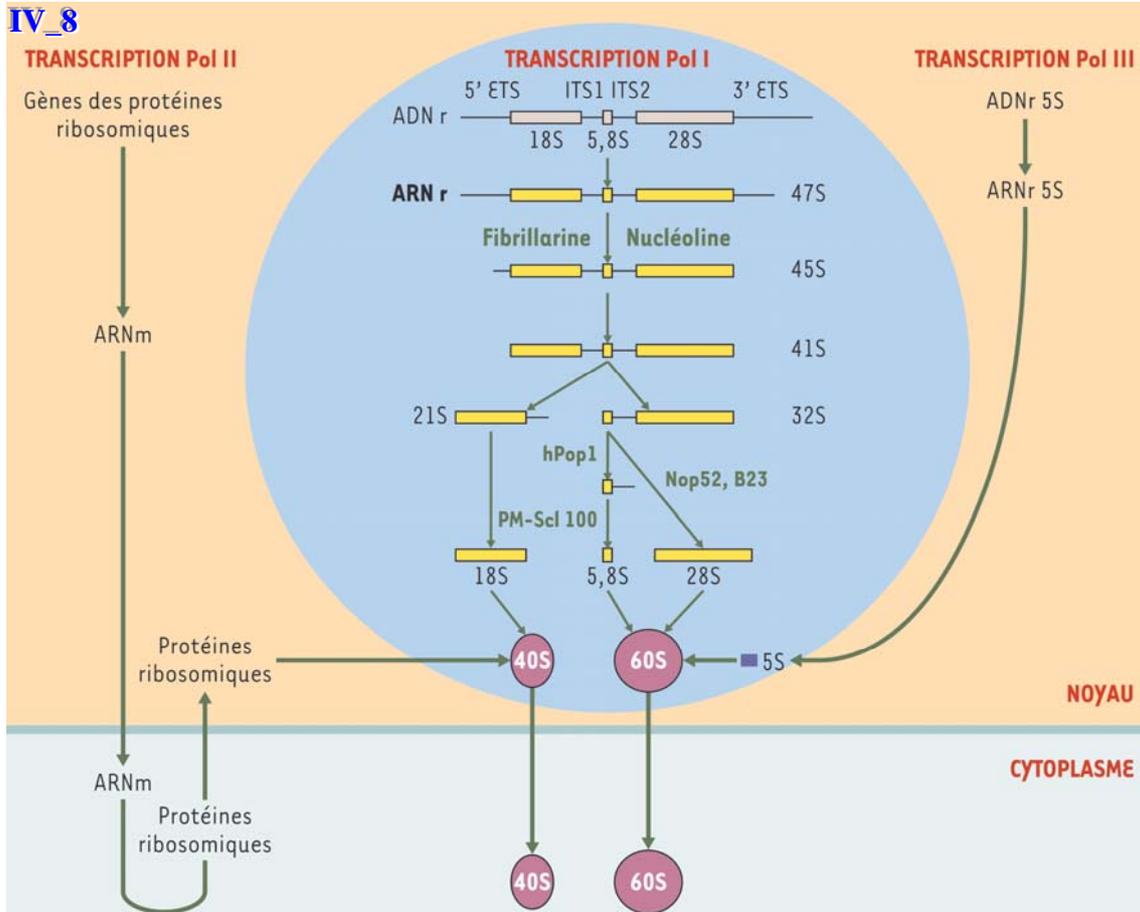


Figure IV_8 - Biogenèse des Ribosomes -

Le nucléole (*cercle bleu*) est le site de synthèse et de maturation des ARNr ribosomiques (ARNr) 28S, 18S et 5,8S et le site d'association avec l'ARNr 5S. C'est également le lieu où les ARNr s'associent avec les protéines ribosomiques. La synthèse des ARNr (*rectangles jaunes*) est suivie de leur maturation, par étapes successives, des séquences ETS (*external transcribed sequence*) et ITS (*internal transcribed sequence traits fins noirs*) par des complexes agissant séquentiellement. Il faut noter que la fabrication des ribosomes nécessite la mise en œuvre des trois machineries de transcription. Les gènes des ARNr 18S, 5,8S et 28S sont transcrits par la Pol.I, l'ARNr 5S par la Pol.III, les gènes codant pour les protéines ribosomiques par la pol.II. Certaines des protéines impliquées dans la maturation sont indiquées en verts. hPop1 : processing of precursor RNAs, Nop52 : nucleolar protein 52, B23 : protéine nucléolaire, PM-Scl100 : 100kDa-polymyositis/scleroderma antigen. Repris de (Hernandez-Verdun and Louvet, 2004)

Les nucléoles sont naturellement les lieux de synthèse des ARNr (*cf. Fig.IV_8 ci-dessous*). La transcription des gènes ribosomiques s'effectue en périphérie des FCs, là où se situent les NORs, alors que la maturation du pré-ARNr débute dans le DFC et se poursuit

pendant sa migration vers GC (Carmo-Fonseca et al., 2000). En effet, la transcription de l'ADNr par la pol.I génère un unique transcrit 47S. La maturation de ce pré-ARNr 47S, en ARNr 28S,18S et 5,8S fonctionnels est un mécanisme extrêmement complexe, qui nécessite de nombreuses modifications post-transcriptionnelles. Entre 100 et 200 petits ARN nucléolaires (*snoRNA* : *small nucleolar RiboNucleic Acid*) et petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires (*snoRNPs* : *small nuclear RiboNucleoprotein Particles*) différents sont requis pour accomplir plusieurs dizaines de méthylations et de pseudo-uridylation du pré-ARNr. Les snoRNPs sont regroupées en deux grandes familles : C/D et H/ACA. De façon générale les snoRNPs C/D servent de guides aux réactions de méthylation alors que snoRNPs H/ACA servent de guides aux réactions de pseudo-uridylation (Filipowicz and Pogacic, 2002). D'autres snoRNPs, la nucléoline et la fibrillarine ou B23 par exemple, effectuent différents clivages du pré-ARNr et l'élimination des régions transcrites externes (*ETS* : *External Transcribed Spacer*) (Eichler and Craig, 1994).

Parmi les fonctions du nucléole, il a été mis en évidence chez la Levure, que la RNase P impliquée dans la maturation de l'extrémité 5' des ARN de transfert (*ARNt*), se concentre principalement dans le nucléole (Jarrous et al., 1999). De plus, chez la Levure, la maturation du pré-ARNr est régulée en fonction de l'activité de la pol.III (Briand et al., 2001). Ces résultats tendent à impliquer le nucléole dans la maturation de certains ARNt.

Le nucléole serait un acteur majeur dans la réponse cellulaire à différents stress. Il a clairement été démontré que le nucléole est un poste de passage essentiel pour la voie de signalisation p53. L'ubiquitine ligase MDM2 est un partenaire cytoplasmique de la protéine p53. MDM2 mène p53 à la dégradation par la voie du protéasome, empêchant tout déplacement de p53 vers le noyau. Suite à différentes agressions délétères pour la cellule, la protéine MDM2 est emprisonnée dans le nucléole par la protéine p14-ARF. p53 est alors libre de se transloquer dans le noyau pour réguler la transcription de gènes suppresseur de tumeur. Il est particulièrement intéressant de noter que p53 interagit avec la nucléoline, facteur d'épissage des ARNr. De ce fait, la majeure partie de la nucléoline nucléolaire est relocalisée vers le nucléoplasme où elle pourra interagir avec la protéine de réplication A (*RPA*) ce qui empêche la maturation des ARNr, l'initiation de la réplication de l'ADN et bloque le cycle cellulaire (Daniely et al., 2002).

D'autres mécanismes de régulation du cycle cellulaire impliquent le nucléole, puisque le nucléole régule la localisation de la phosphatase Cdc14, d'une protéine de régulation de la méiose Pch2 et de la protéine rétinoplastome (*Rbp*), celle la-même contrôle la transition G1/S (Visintin and Amon, 2000). Par ailleurs l'analyse protéomique de nucléole de cellule HeLa montre que la composition du nucléole est modifiée lorsque la pol.I est inhibée par l'Actinomycine D (Andersen et al., 2002), soulignant une fois de plus l'aspect dynamique de la structure du nucléole.

En plus de ses fonctions dans le cycle cellulaire, de nombreuses données indiqueraient que le nucléole est impliqué dans le phénomène de vieillissement cellulaire au même titre que les télomères. Chez la Levure, des changements morphologiques majeurs du nucléole se produisent au cours de la sénescence. Les nucléoles s'élargissent et finissent par se fragmenter. L'accumulation d'ADNr extra-chromosomique circulaire (*ERCs* : *Extrachromosomal rDNA Circles*) dans le nucléole des levures âgées semblerait être à l'origine de ces transformations en interférant avec la machinerie de transcription de la pol.I (Sinclair and Guarente, 1997). Une autre observation en accord avec l'hypothèse que la diminution de la transcription de la Pol.I serait le défaut primaire à l'origine du vieillissement chez la Levure a été rapportée après l'invalidation de *ySGS1*. *ySGS1* est une hélicase nucléolaire impliquée dans la transcription des ARNr, son absence, se traduit par un vieillissement accéléré des cellules (Sinclair et al., 1997).

Même si la présence d'ECRs a été décrite dans plusieurs organismes, le mécanisme de régulation nucléolaire de la sénescence par les ECRs chez la Levure n'est toutefois pas directement applicable aux mammifères. En plus des particularités propres aux Levures qui rendent difficile toute extrapolation de ce modèle aux eucaryotes supérieurs, telle que la présence de nucléoles intègres pendant la division cellulaire ou le fait que les régions télomériques restent de longueur constante chez la levure, l'absence d'ECRs chez les mammifères empêche toute généralisation de ce processus. La mutation de la protéine humaine *Wrn*, homologue de *ySGS1*, est néanmoins responsable du syndrome de Werner, une maladie autosomique récessive rare caractérisée par un vieillissement prématuré. Il a été proposé que parmi le petit nombre d'épisomes provenant du génome humain, l'un ou l'autre puisse remplir des fonctions équivalentes aux ECRs de levure (Johnson et al., 1998), cette hypothèse reste encore à vérifier.

TRAVAUX de THESE

I

VARIATIONS dans l'EXPRESSION et la
LOCALISATION CELLULAIRES de TRF2

I VARIATIONS dans l'EXPRESSION et la LOCALISATION CELLULAIRES de TRF2

I.1) Présentation de l'étude réalisée sur TRF2

Au cours de la spermatogenèse TRF-2 est exprimé au stade pachytène des spermatocytes primaires ; lors de la spermiogenèse il est également exprimé dans les spermatides ronds et allongés (Martianov et al., 2002a). L'expression de TRF-2 débute dans le cytoplasme des spermatocytes primaires, puis se concentre progressivement dans leur noyau et disparaît ensuite de ces spermatocytes primaires lors de la diacinèse. TRF2 réapparaît dans le noyau des spermatides ronds et en périphérie du noyau des spermatides

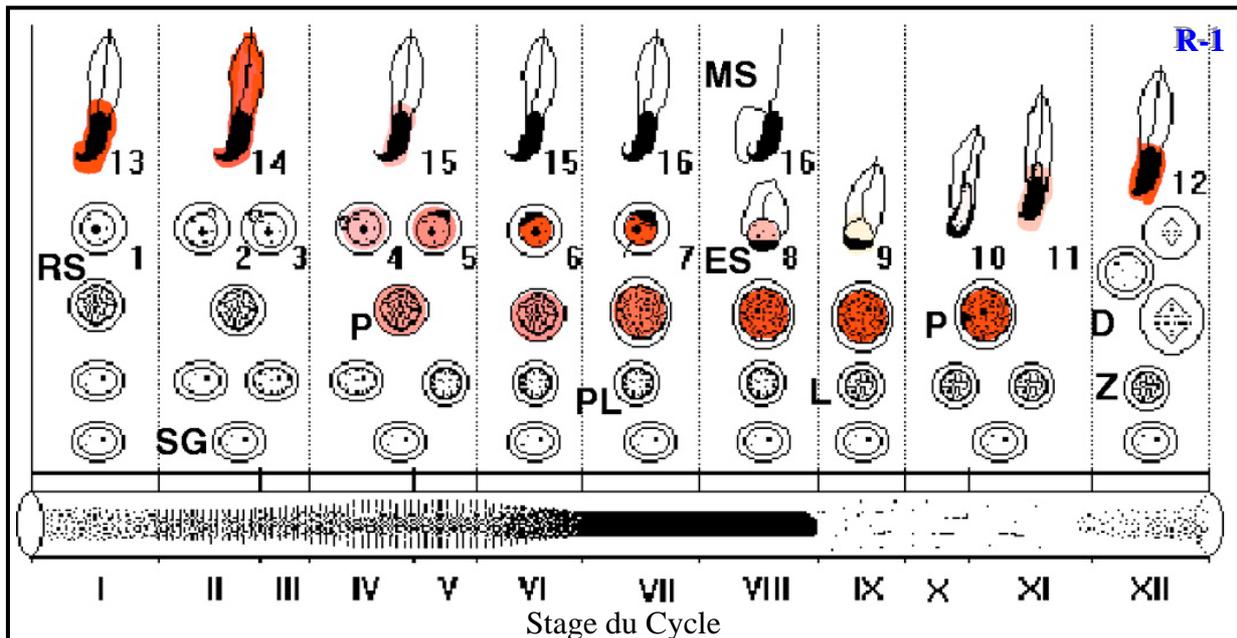


Figure R-1 – Expression de TRF2 au cours de la Spermatogenèse –

TRF2 est représenté en rouge sur ce schéma. Lors de la spermatogenèse, les spermatogonies (SG) diploïdes (2n) se différencient en spermatocytes I (4n). Ces derniers entrent dans une méiose dont la prophase est particulièrement longue et subdivisée en 6 phases : préleptotène (PL), leptotène (L), zygotène (Z), pachytène (P) diplotène et diacinèse (D). Les spermatocytes II (2n') qui résultent de cette division rentrent à leur tour en méiose pour aboutir à la formation de spermatides ronds haploïdes (n). Ces spermatides ronds (RS) vont évoluer en spermatides allongés (ES) pour finalement devenir des spermatozoïdes matures (MS). Adapté de (Martianov et al., 2002a)

allongés pendant la maturation de ces cellules haploïdes (*cf. Fig.R-1*).

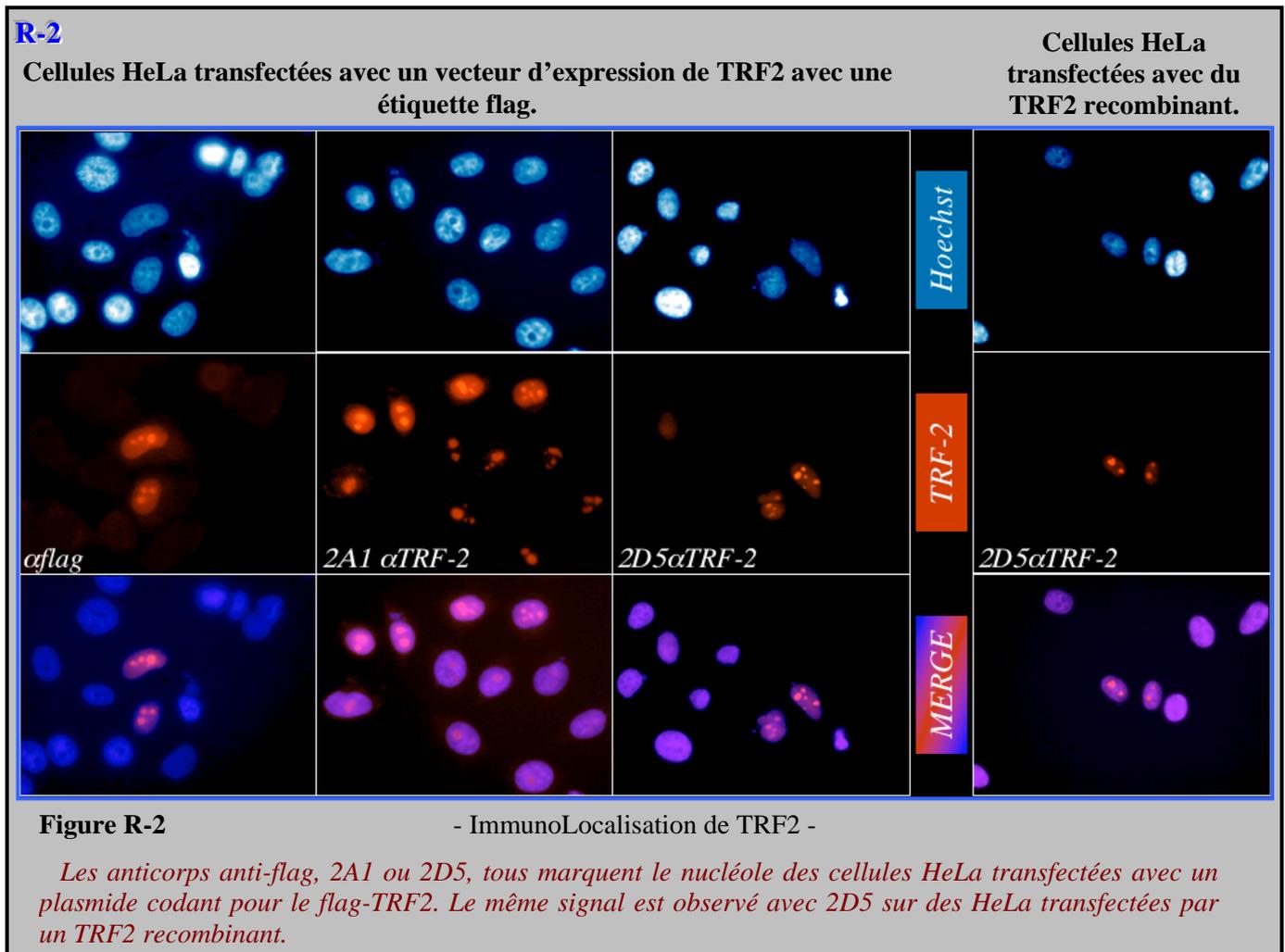
L'immunolocalisation de TRF2 dans les cellules HeLa ou Cos le situe dans les nucléoles et non dans le cytoplasme ou le nucléoplasme, comme c'est le cas pour les gamètes mâles murins. TRF2 ne semble pourtant pas être impliqué dans la transcription par l'ARN pol.I puisque TRF2 n'a jamais été identifié avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle de la pol.I et aussi parce que des clichés de microscopie confocale réalisés au laboratoire démontrent que TRF2 n'est pas associé à l'ADNr transcrit. Les souris mâles *trf2^{-/-}* sont de plus stériles mais viables, ce qui ne correspond pas au phénotype attendu avec un défaut de transcription par la pol.I. TRF2 pourrait donc être stocké sous forme inactive dans les nucléoles des cellules HeLa, à l'image de MDM2 (*cf. IV.2.5 - Le Nucléole.*). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la localisation de TRF2 au cours du cycle cellulaire et essayé de mobiliser ce TRF2 nucléolaire en utilisant divers stress et signaux mitogéniques. Parmi eux, seule une faible concentration d'actinomycine D, inhibant la pol.I, est capable de délocaliser rapidement TRF2 du nucléole vers le nucléoplasme. Alors que l'inhibition de la pol.II par l' α -amanitine n'a, par exemple, aucun effet sur la localisation de TRF2.

Le Dr. C. MAISON et ses collaborateurs ont démontré qu'un ou plusieurs ARN(s) étaient impliqués dans l'organisation de la chromatine (Maison et al., 2002). Après les résultats que nous avons obtenus avec l'actinomycine D sur la localisation de TRF2, nous avons évidemment voulu savoir si des ARN(s) peuvent être impliqués dans la structure de la chromatine. Pour cela nous avons perméabilisé des cellules HeLa avec de la saponine. Ces cellules perméabilisées, toujours vivantes, ont ensuite été mises en présence de RNase A. Les résultats obtenus avec cette expérience sont les mêmes que ceux observés avec l'actinomycine D, à savoir une délocalisation rapide de TRF2 dans tout le nucléoplasme.

Des études préalables, exécutées dans d'autres laboratoires, avaient mis en avant un rôle potentiel de TRF2 dans le cycle cellulaire des cellules NIH 3T3. Nous avons alors voulu étudier TRF2 dans ces cellules. De façon très surprenante, l'anticorps que nous avons généré au laboratoire contre TRF2 ne le détecte pas dans ces cellules par immunomarquage. Pour remédier à cela nous avons généré des lignées de NIH 3T3 exprimant, de manière stable, un TRF2 avec une étiquette flag. Dans ces cellules, TRF2 est nucléaire et non nucléolaire ou cytoplasmique. Les transfectants qui expriment le flag-TRF2 dans le nucléoplasme, ont un taux de prolifération significativement réduit par rapport aux cellules d'origine. De même, le nombre de cellules en phase S est accru de 10% par rapport aux cellules d'origine.

I.2) Notre Anticorps est Bel et Bien Spécifique de TRF2.

Nos études sont principalement basées sur des techniques d'immunodétection, il est donc indispensable de lever toute ambiguïté sur la spécificité de notre anticorps anti-TRF2. L'anticorps 2A1 a été généré, chez la souris, contre la protéine TRF2 entière, cet anticorps permet le marquage de TRF2 dans les testicules des souris *trf2^{+/+}* ou *trf2^{+/-}*, alors qu'il ne produit aucun signal dans les testicules de Souris *trf2^{-/-}*. Dans des cellules HeLa transfectées avec un plasmide d'expression de TRF2 avec une étiquette flag, l'anticorps 2A1 et anti-flag donnent le même signal. Ce signal nucléolaire est confirmé par un autre anticorps anti-TRF2, 2D5, également dirigé contre la protéine entière, mais dont l'avidité pour TRF2 est moindre que celle de 2A1. L'anticorps 2D5, uniquement capable de détecter du TRF2 surexprimé, marque les nucléoles de cellules HeLa transfectées pour la protéine TRF2 (*cf. Fig.R-2 ci-dessous*). L'ensemble de ces données démontre que l'anticorps 2A1, dirigé contre TRF2, est spécifique de cette protéine dans les cellules murines et humaines.



I.3) Publication.

Cell-specific Nucleolar Localization of TBP-related Factor 2

Philippe Kieffer-Kwon, Igor Martianov, and Irwin Davidson

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
Centre National de la Recherche Scientifique,
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
Université Louis Pasteur,
67404 Illkirch Cédex, France

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

Cell-specific Nucleolar Localization of TBP-related Factor 2

Philippe Kieffer-Kwon, Igor Martianov, and Irwin Davidson

Molecular Biology of the Cell, 2004, Vol. 15, N° 10, Pages 4356-4368

Pages 4356 à 4368 :

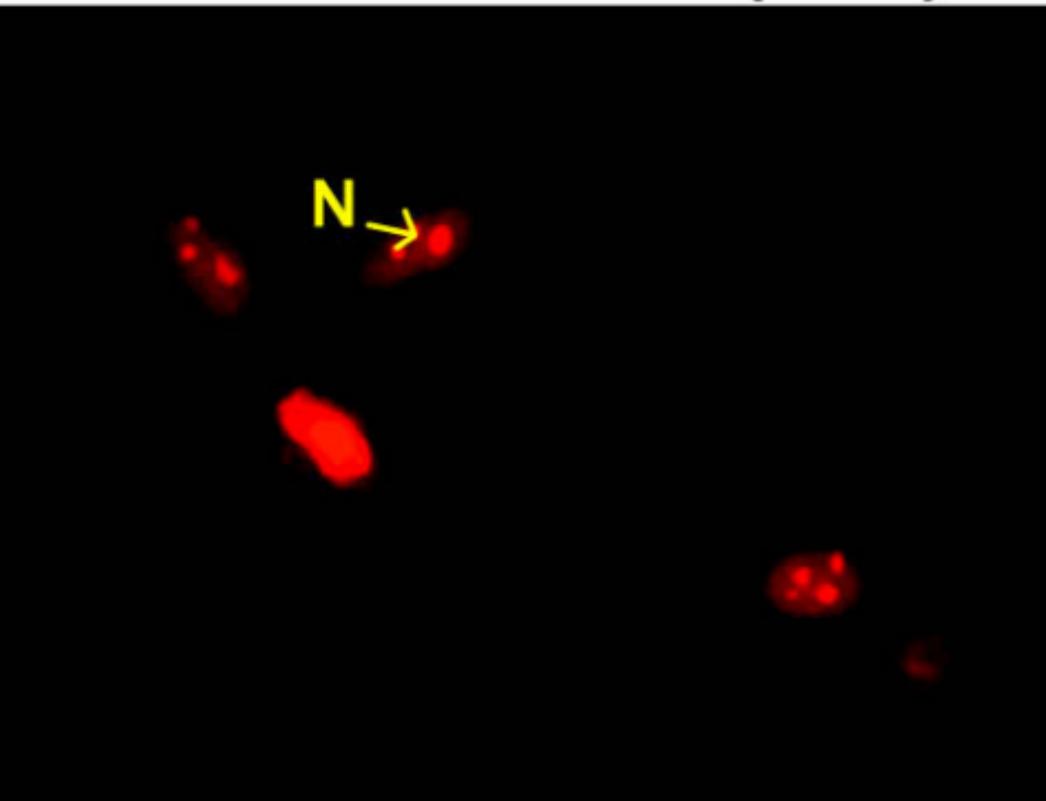
La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/15/10/4356>

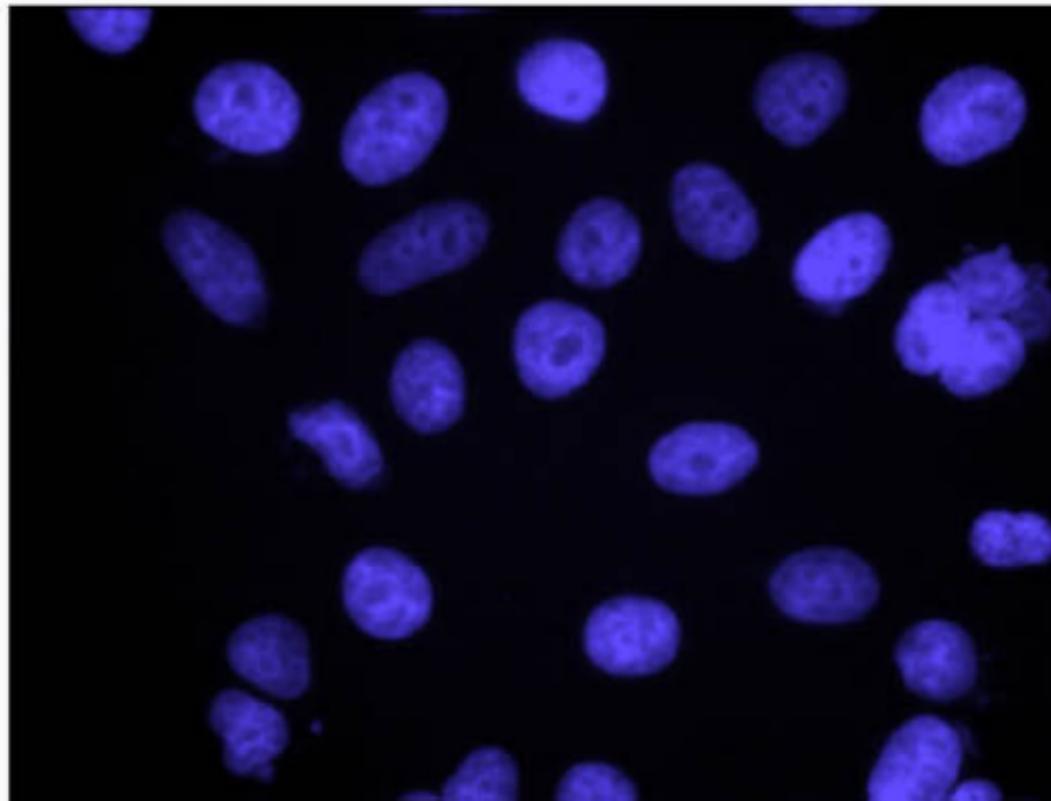
Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Transfected Flag-TRF2

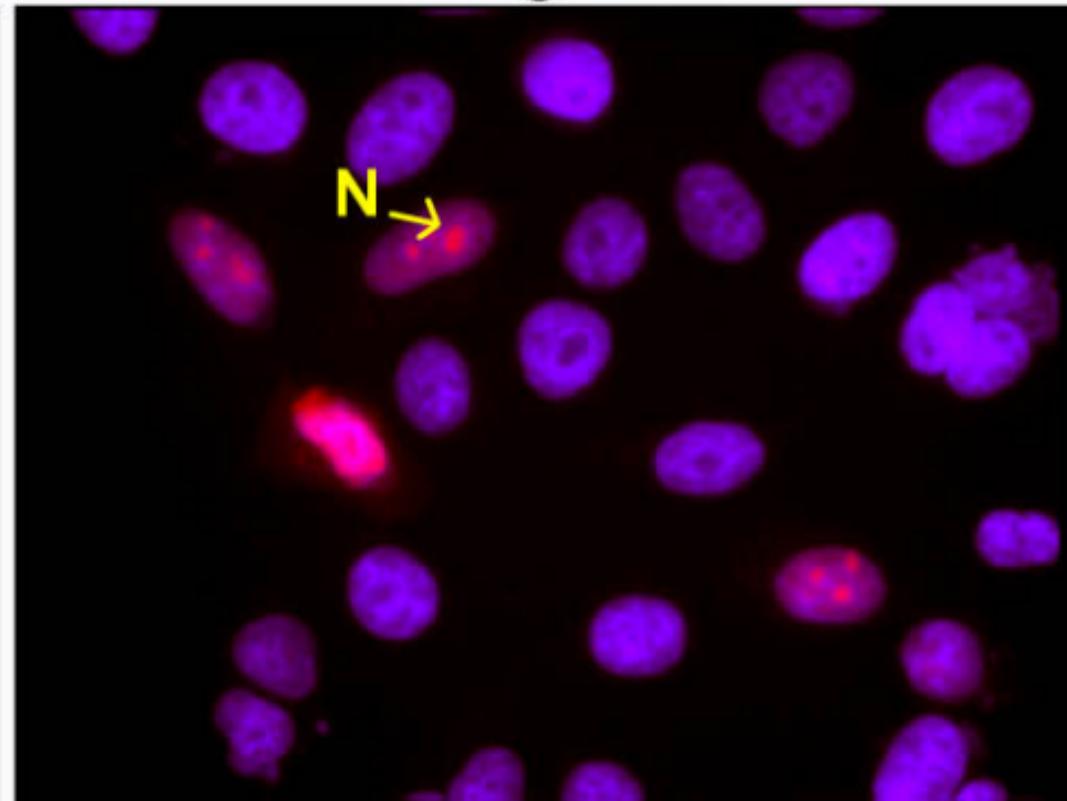
Anti-TRF2 (2D7)



Hoechst

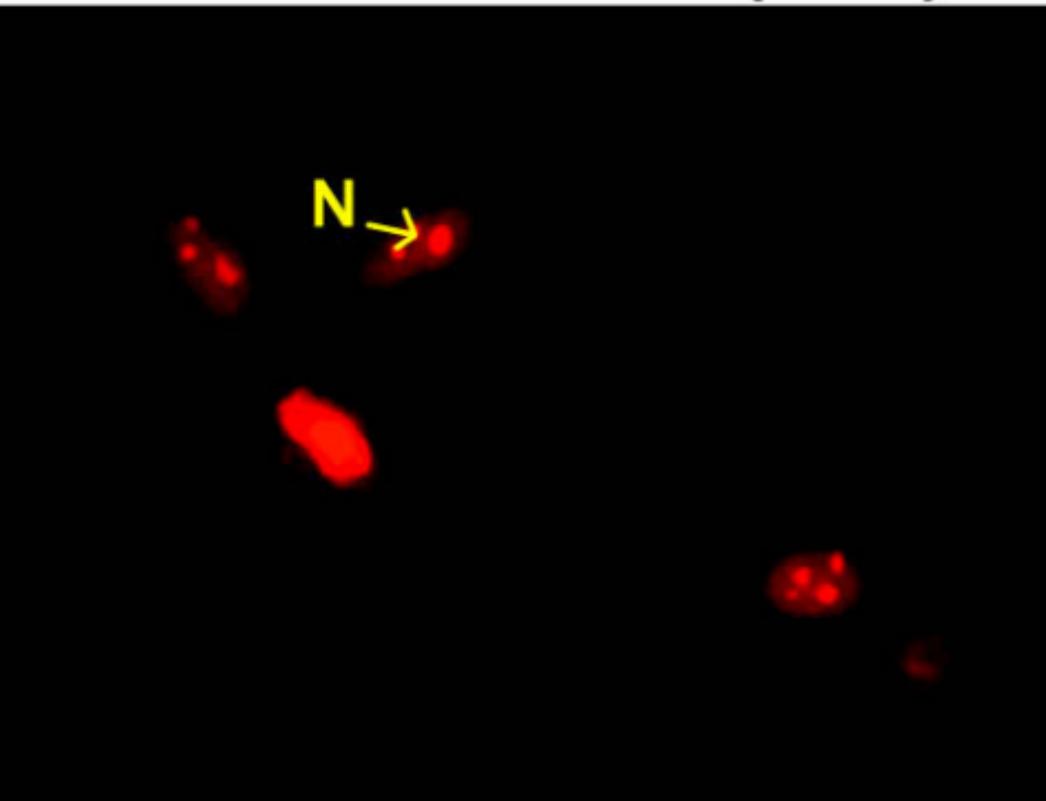


merge

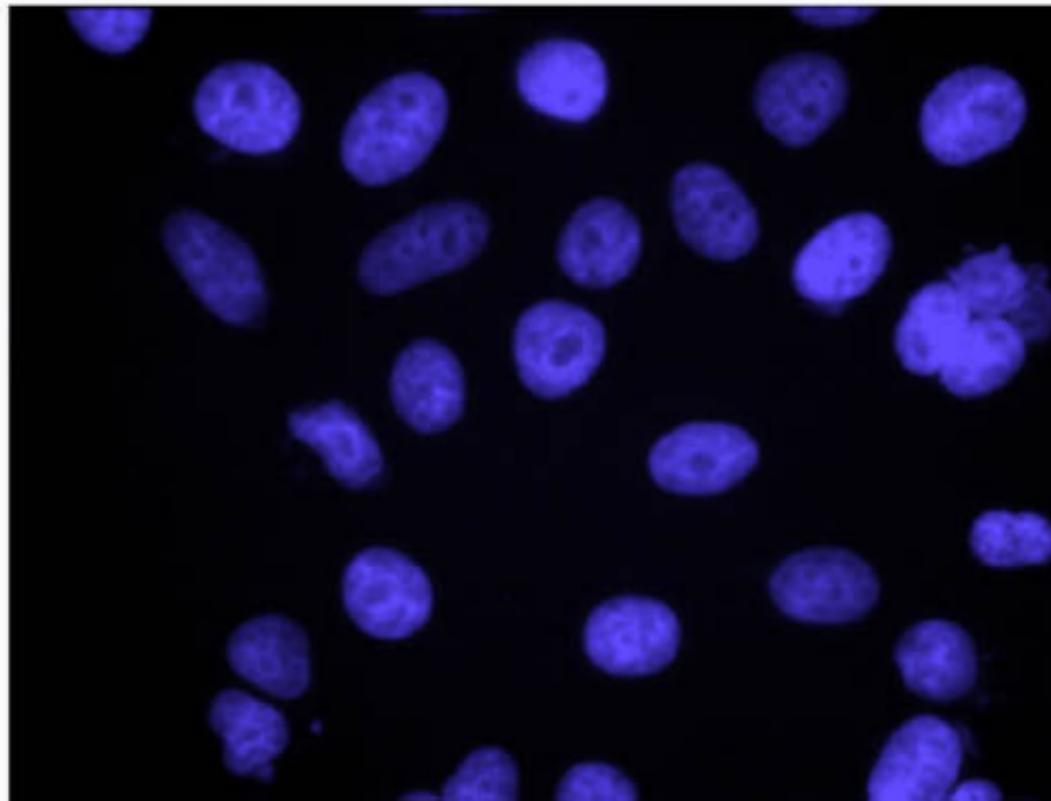


Transfected Flag-TRF2

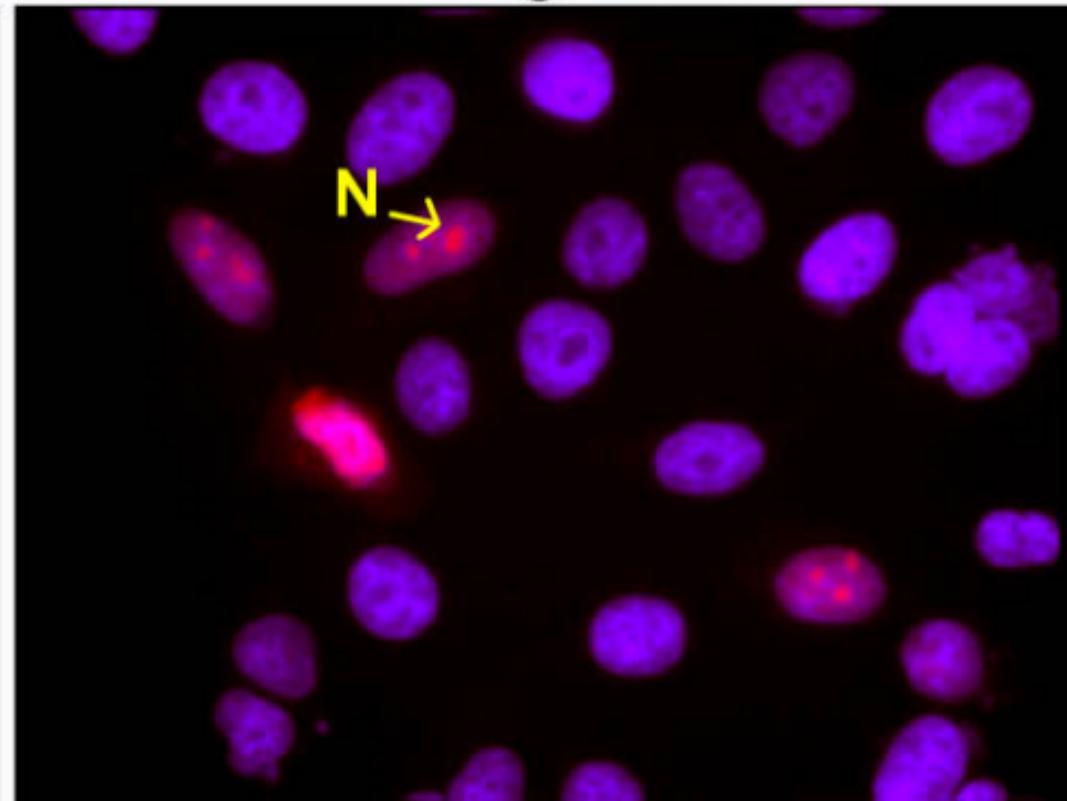
Anti-TRF2 (2D7)



Hoechst

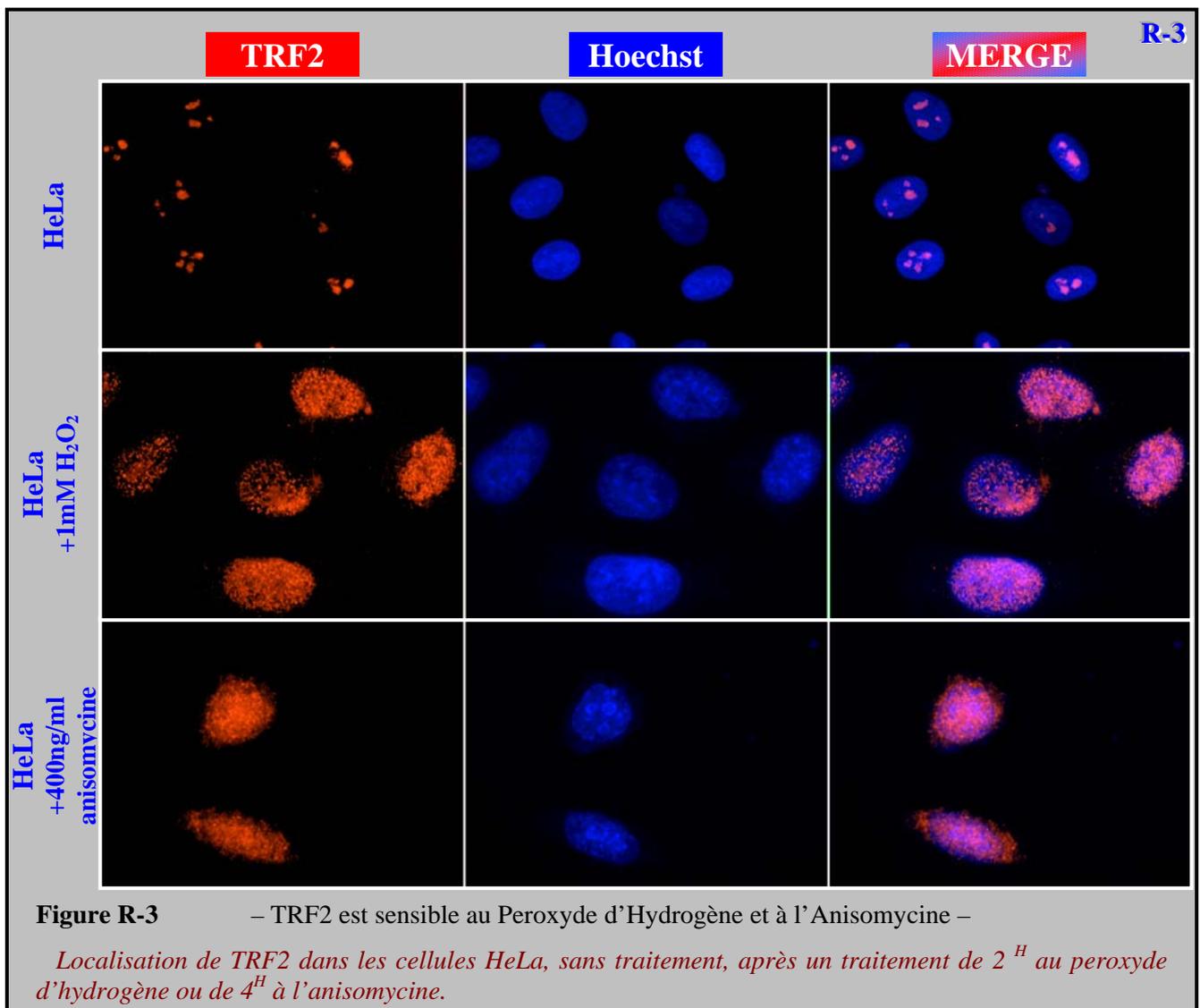


merge



I.4) Résultats Supplémentaires.

Le Dr. I. GRUMMT a dévoilé, à Heidelberg lors du « 6th EMBL Transcription Meeting », que la protéine nucléolaire TIF-IA/RRN3p se relocalise dans le nucléoplasme après un stress oxydatif (Mayer et al., 2005). A la suite de ces travaux, nous avons testé l'impact du stress oxydatif sur la localisation de TRF2 dans les cellules HeLa. Ce stress a été induit soit par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) soit de l'Anisomycine, un puissant activateur des protéines kinases impliqués dans les voies de signalisation liées au stress (*SAPKs : Stress-Activated Protein Kinases*) (Martindale and Holbrook, 2002). Après 2^H en présence de 1mM d'H₂O₂ ou après 4^H en présence de 400ng.ml⁻¹ d'Anisomycine, TRF2 quitte le nucléole et est détectable dans l'ensemble du nucléoplasme (*cf. Fig.R-3 ci-dessous*).



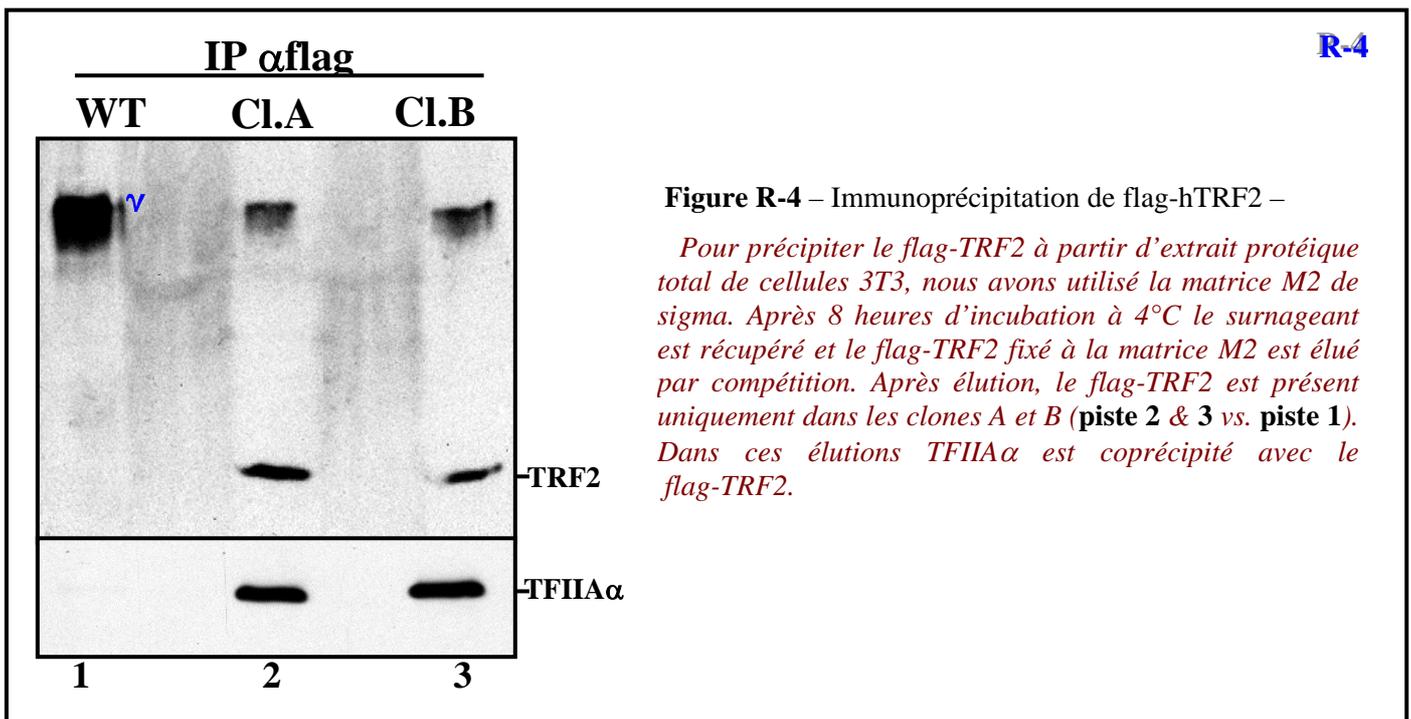
L'ensemble des traitements étudiés et leur influence sur la localisation de TRF2 sont résumés dans le tableau R-A.

TRAITEMENT	DOSE	OBSERVATIONS	TRF2 LOCALISATION
hTNF α	10 ng.ml ⁻¹	2 ^H 4 ^H 6 ^H 12 ^H 24 ^H	Nucléolaire
	20 ng.ml ⁻¹	0,5 ^H 1 ^H 1,5 ^H 2 ^H 4 ^H 6 ^H 12 ^H 24 ^H	
UV	10 J.m ⁻²	2 ^H 4 ^H 6 ^H 12 ^H 24 ^H	Nucléolaire
	30 J.m ⁻²	0,5 ^H 1 ^H 1,5 ^H 2 ^H	
	55 J.m ⁻²	2 ^H 4 ^H 6 ^H 12 ^H 24 ^H	
TPA	100ng.ml ⁻¹	1 ^H 7 ^H 14 ^H 26 ^H	Nucléolaire
sérum	0%	24 ^H 48 ^H 72 ^H	Nucléolaire
9,13 di-cis RA	1 μ M	7 ^H 14 ^H 26 ^H	Nucléolaire
cAMP	250 μ M	1 ^H 7 ^H 14 ^H	Nucléolaire
MG132	50 μ M	7 ^H	Nucléolaire
EGF	50mM	1 ^H 7 ^H 14 ^H 24 ^H	Nucléolaire
AdOX	1 à 200 μ M	24 ^H	Nucléolaire
α -Amanitine	5 μ g.ml ⁻¹	0,5 ^H 2 ^H 4 ^H 6 ^H	Nucléolaire
Anisomycine	50ng.ml ⁻¹	0,5 ^H 2 ^H 4 ^H 6 ^H	Nucléolaire
	400ng.ml ⁻¹	0,5 ^H 2 ^H	Nucléolaire
	400ng.ml ⁻¹	4 ^H 6 ^H	Nucléolaire
H ₂ O ₂	1mM	2 ^H	Nucléolaire
Actinomycine D	0,2 μ g.ml ⁻¹	0,25 ^H 0,5 ^H 1 ^H 1,5 ^H 7 ^H 14 ^H	Nucléolaire

Tableau R-A – Traitements Appliqués aux Cellules HeLa –

Afin de mobiliser le TRF2 nucléolaire des cellules HeLa, diverses drogues ont été testées pendant un temps plus ou moins long. Après chaque traitement TRF2 a été immunolocalisé grâce à l'anticorps 2A1.

Nous avons également mis en évidence, en utilisant un anticorps anti-flag, la copréciptation du TFIIA α avec le flag-TRF2 à partir d'extrait protéique total de NIH 3T3 exprimant de manière stable la protéine étiquetée (cf. FigR-A ci-dessous).



I.5) De Frustrants Echecs.

Après avoir observé l'effet de la RNase A sur la localisation de TRF2 dans les cellules humaines (HeLa), nous avons voulu savoir s'il serait possible d'induire une localisation nucléolaire de TRF2 dans les cellules murines (NIH 3T3) qui expriment constitutivement le flag-TRF2 dans leur nucléoplasme. Nous avons pour cela incubé les clones A et B perméabilisés avec de la saponine, dans du PBS complétement avec $0,3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'extrait d'ARN total de cellules HeLa pendant 15min à 23°C après les avoir préalablement perméabilisées. Suite au traitement, les protéines flag-TRF2 et HP1 α ont été repérées par immunomarquage.

Dans certains cas la localisation de TRF2 ainsi que la structure chromatiniene semblaient dictées par des ARNs différents selon l'espèce (*cf. Fig.R-5*). Les faibles taux de cellules NIH 3T3 affectées par ce traitement, moins d'une sur cinquante, ne permirent néanmoins de conclure quant à un effet biologique réel. En dépit de mes nombreux efforts, je n'ai jamais pu trouver les conditions optimales pour réaliser cette expérience. Même en microinjectant directement les ARNs de HeLa dans les noyaux de cellules NIH 3T3 afin d'éviter l'effet délétère d'une perméabilisation trop longue, les résultats ne sont pas reproductibles.

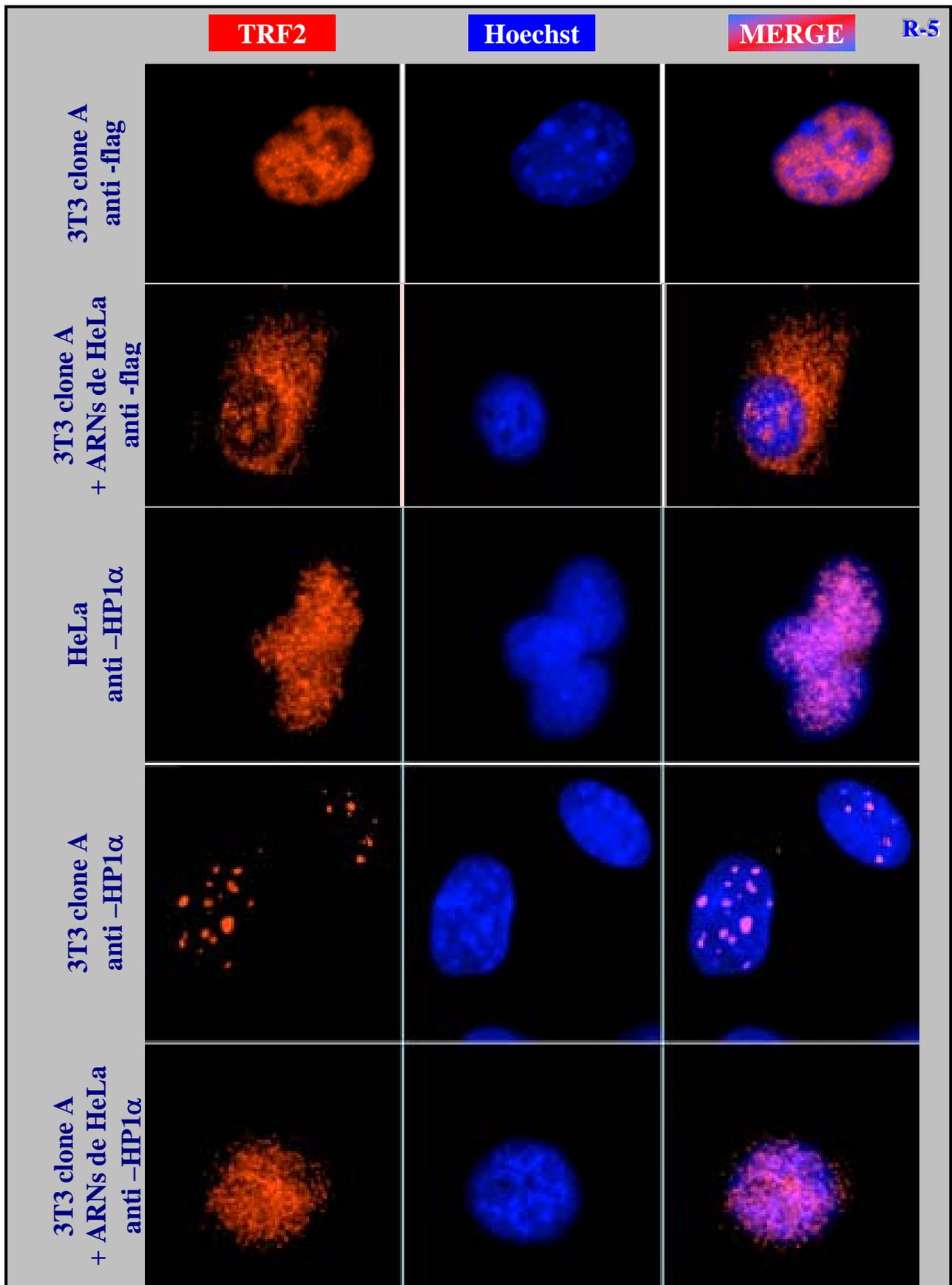


Figure R-5

– Des ARNs Gouverneraient-ils le Noyau ? –

Ces résultats, malheureusement trop peu observés pour être considérés comme significatifs, montrent le TRF2 localisé dans les cellules de NIH 3T3 après exposition à des ARNs de HeLa. Ces ARNs de HeLa influenceraient également la structure de la chromatine des cellules NIH 3T3.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

I.6) TRF2, Graine de la Discorde.

Nos résultats vont à l'encontre de ceux obtenus antérieurement par l'équipe du Dr. T.A. TAMURA. TRF2 est décrit par cette équipe comme un facteur cytoplasmique dans les cellules DT40, NIH 3T3 et HeLa, facteur qui, suite à une exposition aux ultraviolets ou au méthyl-méthane-sulfonate, se focalise dans le noyau pour induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Nakadai et al., 2004; Shimada et al., 2003). Nous avons observé au contraire que dans les cellules HeLa et Cos, la protéine TRF2 est nucléolaire, insensible aux radiations ionisantes, mais qu'elle se relocalise dans le nucléoplasme suite à un stress oxydatif ou un arrêt de la pol.I. Nous avons de plus remarqué, que le TRF2 endogène est très faiblement exprimé dans les cellules NIH 3T3 et que son expression constitutive dans le nucléoplasme induit une pause du cycle cellulaire en S/G2. Le seul aboutissement commun qu'il y ait entre les travaux du Dr. M. SHIMADA et ceux de notre équipe est l'implication de TRF2 dans un mécanisme d'entrave à la prolifération cellulaire.

Il semblerait que les résultats obtenus avec les cellules aviaires DT40 ne soient pas directement applicables aux cellules de mammifères puisqu'il a déjà été montré, par exemple, que les cellules DT40 hétérozygotes pour TBP présentent un défaut du cycle cellulaire (Um et al., 2001) alors que les cellules ES de Souris hétérozygotes pour TBP sont normales (Martianov et al., 2002b). Comme nous l'avons vu dans l'introduction (§III.8.2-TBP Related Factor 2.) le comportement de TRF2 diffère entre *C.elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus*. Il est donc envisageable que le comportement de TRF2 ne soit pas similaire entre cellules aviaires et humaines. Il est néanmoins difficile d'avancer de tels arguments lorsque l'on considère les divergences entre les observations des cellules murines 3T3 et humaines HeLa réalisées d'un côté par l'équipe du Dr. A.T. TAMURA et de l'autre côté par la nôtre. Sur la base d'observations faites avec la protéine de fusion GFP-TRF2, le Dr. J.A. CHONG et ses collaborateurs ont montré, entre autres, que TRF2 est une protéine nucléolaire dans les cellules HeLa ou HEK-293 et nucléoplasmique dans les cellules NIH 3T3, ce qui conforte nos interprétations et met en doute celles de l'équipe du Dr. T.A. TAMURA.

Si la situation quant à la localisation de TRF2 dans diverses lignées modèles tend à s'éclaircir, le profil d'expression de TRF2 chez la Souris est encore sujet à controverse. Les travaux du Dr. I. MARTIANOV prouvent incontestablement la production de TRF2 dans les cellules germinales. Pour le Dr. J.A. CHONG et ses collaborateurs, la protéine TRF2 est exprimée de façon ubiquitaire et plus particulièrement dans le foie et le pancréas. Pour notre

part, nous n'avons pu détecter TRF2 que dans des extraits protéiques de testicules et de cerveaux. Même les extraits protéiques obtenus à partir de culture primaire d'hépatocytes murins, embryonnaires ou adultes, sondés avec l'anticorps 2A1 semble de pas contenir de TRF2. Des procédures expérimentales différentes pour réaliser les extraits protéiques pourraient être à l'origine de ces dissemblances entre les résultats du M CHONG et les nôtres.

I.7) 2A1, un AntiCorps Malicieux.

La spécificité de l'anticorps 2A1 dirigé contre TRF2 n'est plus à démontrer ; il permet l'identification de TRF2, étiqueté ou non, dans les nucléoles des cellules HeLa (immunohistochimie) ou dans n'importe quel extrait protéique (Western blot). Il est alors surprenant d'observer que le 2A1 est incapable d'immunomarquer le flag-TRF2 dans le nucléoplasme des cellules NIH 3T3, de même qu'il est inutilisable pour immunoprécipiter TRF2 à partir d'un extrait protéique quel que soit le type cellulaire.

L'anticorps monoclonal 2A1 a été généré par injection de la protéine TRF2 entière à des souris. L'épitope de cet anticorps n'était donc pas connu *a priori*. Puisque qu'un comarquage de TRF2 par 2A1 et de TBP par l'anticorps anti-TBP utilisé au laboratoire est réalisable, l'épitope de 2A1 doit se situer dans une région peu conservée non reconnue par l'anticorps anti-TBP (*cf. Fig.R-6*). En se basant sur ce critère le Dr. Mustapha OULAD-ABDELGHANI (*IGBMC, 67404 Illkirch, communication personnelle*) a montré par test ELISA que la protéine TRF2 tronquée pour 50 résidus N-terminaux et que le polypeptide PE18, correspondant aux résidus 114 à 135 de TRF2, sont reconnus par 2A1. PE18 contiendrait donc l'épitope du 2A1.

L'anticorps 2A1 pourrait reconnaître TRF2 dans le nucléole et être incapable d'interagir avec lui dans le nucléoplasme pour la raison que l'environnement moléculaire de TRF2 change d'une situation à l'autre. TRF2 présente ainsi des activités différentes selon sa localisation : il est inactif dans les nucléoles des HeLa, régulateur négatif de la prolifération cellulaire dans le nucléoplasme des NIH 3T3. Dans le nucléoplasme, un éventuel partenaire nucléaire de TRF2 pourrait donc masquer l'épitope du 2A1.

Ce partenaire pourrait être TFIIB. La région P114 à H135 (PE18) correspond en effet à un segment de TBP paralogue de TRF2, contenant l'hélice $\alpha H1'$, le feuillet $\beta S2'$ et le second étrier reconnus par TFIIB (*cf. §III.1.2 Le Domaine Carboxy-Terminal*). L'interaction

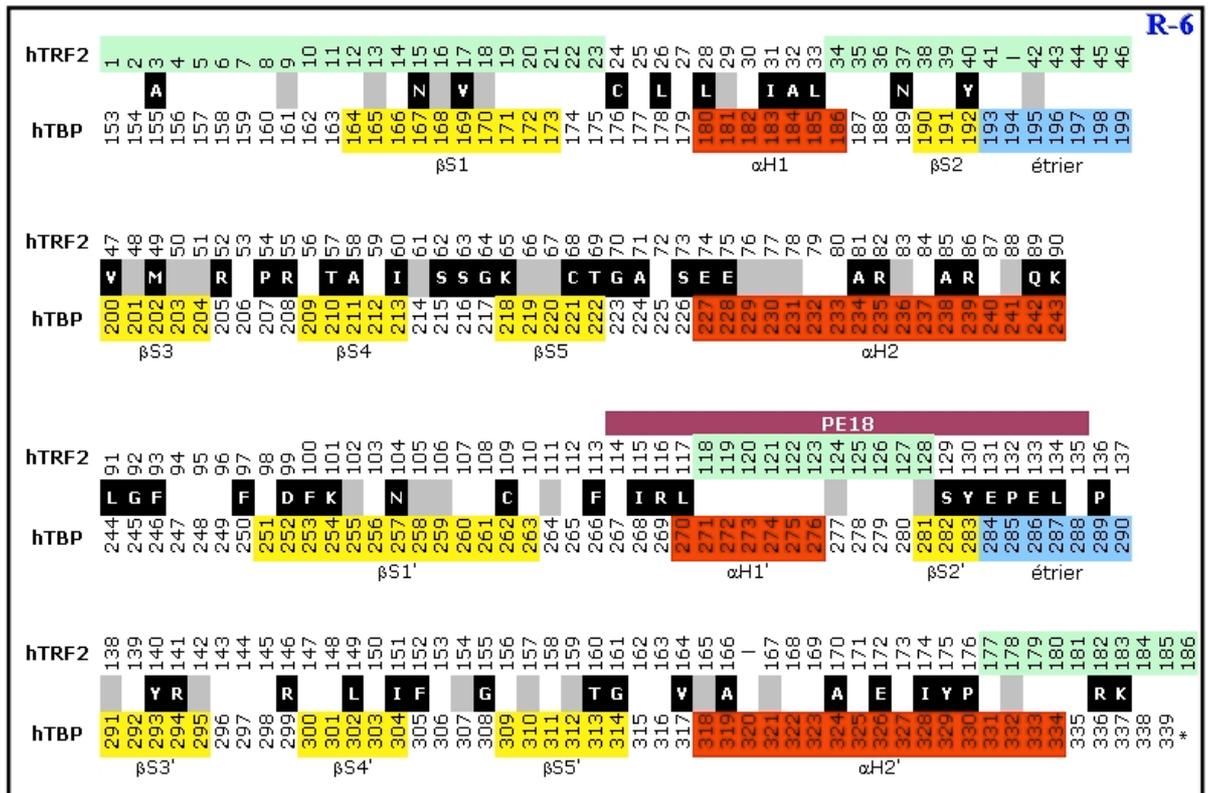


Figure R-6 – Localisation de l'Épitope de l'Anticorps Anti-TRF2 : 2A1 –

Alignement entre la séquence de hTRF2 (en haut) et la séquence de hTBP (en bas).

Les motifs de structures secondaires ont été reportés sur la séquence de TBP : en jaune les feuillets β , en rouge les hélices α et en bleu les étriers.

Les résidus identiques entre ces deux protéines sont rapportés sur fond noir alors que les résidus différents ayant une nature physicochimique et un encombrement comparables sont symbolisés par des rectangles gris.

Les principales zones susceptibles d'accueillir un épitope séquentiel, spécifique à TRF2 sont surlignées en vert. La région correspondant au polypeptide compétiteur PE18 utilisé en test ELISA est indiquée en violet.

TRF2/TFIIB a été montrée *in vitro* (Rabenstein et al., 1999) mais n'a pas encore été rapportée *in vivo*. TFIIB interagit principalement avec l'étrier qui suit le feuillet $\beta 2'$ de TBP, au niveau de résidus présents dans TRF2. TFIIB entre également en contact avec deux résidus de l'hélice $\alpha H1'$ absents dans TRF2. Dans le cas où l'épitope du 2A1 se situerait aux alentours de l'hélice $\alpha H1'$ hypothétique de TRF2, TFIIB complexé à TRF2 camouflerait cette zone, ce qui interdirait toute reconnaissance de TRF2 par 2A1.

Force est de constater que 2A1 est néanmoins capable de reconnaître TRF2 dans le nucléoplasme des cellules HeLa traitées avec de l'actinomycine D, de la RNase A, du peroxyde d'hydrogène, de l'anisomycine ou quand TRF2 est surexprimé. Ceci peut sans doute être expliqué en terme de cinétique. La libération massive du TRF2 contenu dans le nucléole

ou sa surproduction font qu'une partie de la population de TRF2 serait encore libre de tout partenaire et par conséquent, reconnaissable par 2A1.

L'anticorps 2A1 peut également immunolocaliser TRF2 dans le nucléoplasme des cellules germinales mâles, où TFIIB est exprimé de manière ubiquitaire. Peut-être cela signifie-t-il que la fonction de TRF2 dans les cellules somatiques et germinales diffère. Rien n'indique en effet que TRF2 soit un facteur de transcription dans ces dernières.

Il n'est enfin pas à exclure qu'un partenaire nucléaire de TRF2 non encore identifié, présent dans les fibroblastes murins et non dans les cellules germinales, soit à l'origine de l'occultation de l'épitope du 2A1 dans le nucléoplasme des cellules NIH 3T3. Quoi qu'il en soit, l'identification du partenaire nucléoplasmique de TRF2 qui reconnaît également l'épitope du 2A1 ferait de cet anticorps un outil précieux dans la compréhension des mécanismes physiologiques dans lesquels TRF2 est impliqué.

I.8) TRF2 & TFIIA, « *Je t'aime, moi non plus* »

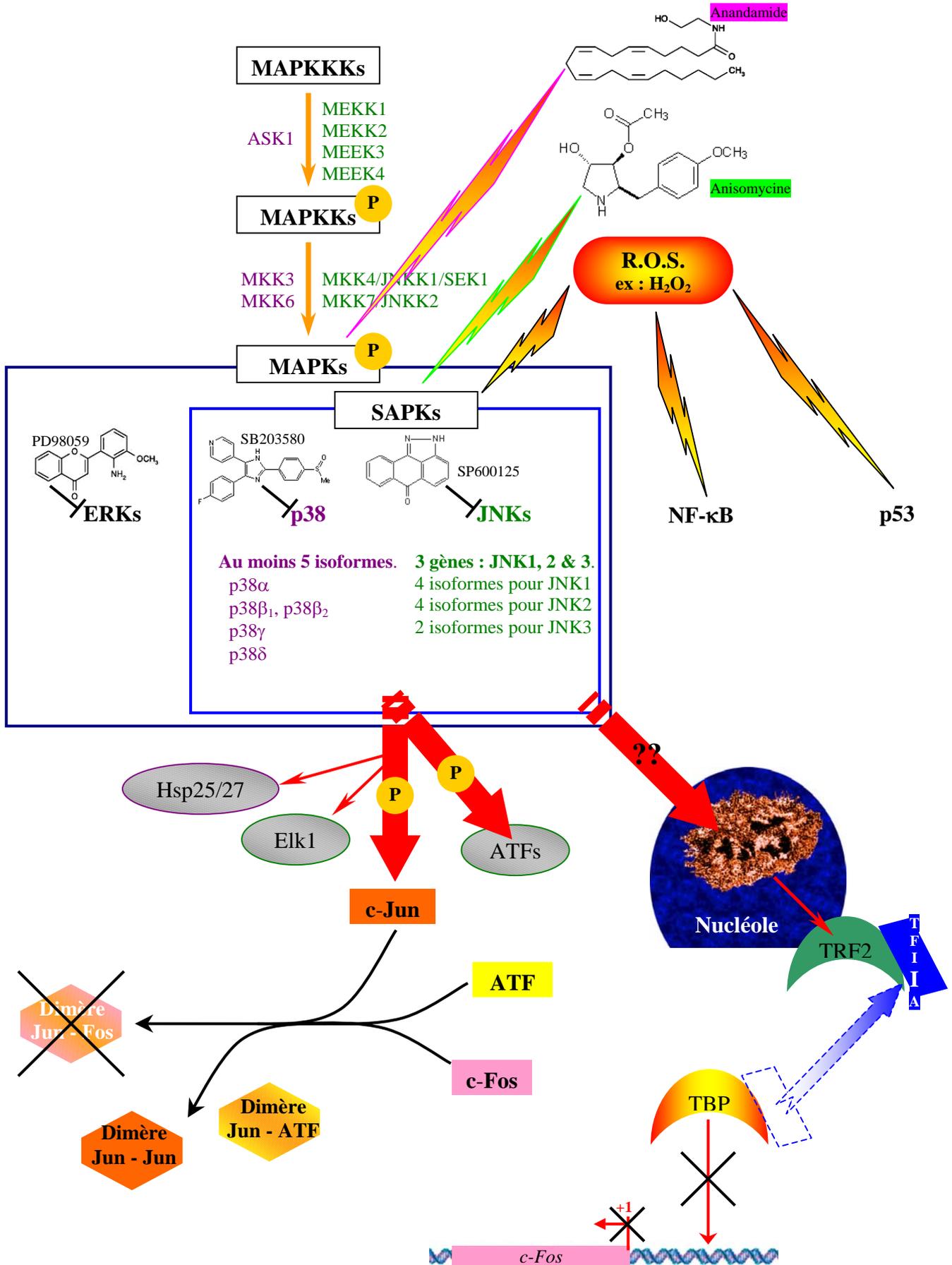
Au vu de l'alignement des séquences de hTRF2 et hTBP (*cf. Fig.III_6*), l'interaction entre TRF2 et TFIIA n'a rien d'étonnant puisque 71% des résidus de TBP qui lient TFIIA, dans les structures établies par diffraction des rayons X, sont présents dans hTRF2 ; 82% des résidus de l'hélice α H2 de hTBP sont retrouvés dans hTRF2, l'hélice α H2 étant indispensable pour l'interaction avec hTFIIA (*cf. §III.5 Cartographie des Sites d'Interaction de TBP*). L'affinité de TRF2 pour TFIIA est plus de cinq fois supérieure à celle de TBP pour ce GTF. Le K_D (TRF2/TFIIA) est de l'ordre de 1,5nM alors que le K_D (TBP/TFIIA) est de 10nM (Nakadai et al., 2004). Cela signifie qu'en dehors de toute régulation, TFIIA interagit avec TRF2 plutôt qu'avec TBP. Le Pr. Martin TEICHMANN a d'ailleurs pu mettre en évidence un complexe TFIIA/TRF2 en immuno-précipitant TRF2 à partir d'extrait nucléaire de cellules HeLa (Teichmann et al., 1999). L'extraction détruisant, et pour cause, la compartimentation subnucléaire, TRF2 a tout loisir de contacter TFIIA.

L'interaction de TFIIA et TRF2 est particulièrement intéressante si l'on considère la compartimentation de TRF2 que nous avons mise en évidence dans les cellules HeLa et Cos. La protéine TRF2 quant elle est séquestrée dans le nucléole, très certainement par un snoRNA et sous une forme inactive, ne peut lier TFIIA. La totalité de ce GTF est alors disponible pour initier la transcription des gènes de classe II en interagissant avec TBP. Dans les cellules

HEK-293, quand TRF2 est nucléoplasmique, il titre TFIIA de tel sorte que TBP, privé de ce dernier, ne peut mobiliser efficacement la machinerie de transcription sur certains promoteurs de classe II, celui du proto-oncogène cFos par exemple (Chong et al., 2005). Dans un autre processus, l'interaction TRF2/TFIIA conduit aussi à l'activation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, NF1 entre autres (Chong et al., 2005). Dans les cellules NIH 3T3, la surexpression dans le nucléoplasme de la protéine TRF2 ralentit la prolifération cellulaire. Or, nous avons observé que TRF2 quitte le nucléole des cellules HeLa suite à des stress aboutissant à un tel ralentissement. Le passage de TRF2 du nucléole au nucléoplasme pourrait donc être un élément clef dans le contrôle du cycle cellulaire, comme cela a été décrit pour TIF-IA/RRN-3 (Mayer et al., 2005). Il est aussi intéressant de noter que TRF2 est capable d'interagir avec p55, forme non clivée de TFIIA $\alpha\beta$ présente dans de nombreux sarcomes (Chong et al., 2005). Si la concomitance de ces événements dans un même type cellulaire venait à être avérée, TRF2 pourrait alors être envisagé comme un facteur participant à la prévention de l'oncogenèse chez les mammifères.

I.9) TRF2 et Jun, Amis ou Ennemis ?

L'effet du peroxyde d'hydrogène ou celui de l'anisomycine sur la localisation de TRF2 dans les cellules HeLa sont extrêmement spécifiques. Dans les cellules dont l'apoptose a été induite par ces traitements, TRF2 est nucléoplasmique alors que dans les cellules entrées en apoptose suite à une exposition au TPA, au TNF α ou aux UVs, TRF2 reste nucléolaire. La mobilisation du TRF2 nucléolaire semble donc spécifiquement impliquée dans des réponses aux stress oxydatifs. Les stress oxydatifs activent de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, les mieux connues parmi elles, étant les voies de transduction liées à p53, NF- κ B, et aux protéines kinases activées par le stress (*SAPKs : Stress-Activated Protein Kinases*). Seules les SAPKs, protéines kinases à activités mitogènes (*MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases*), sont activées par l'anisomycine. Les SAPKs sont subdivisées en deux familles : la première englobe les isoformes de la protéine p38 et la seconde est constituée par les produits des 3 gènes codant les kinases N-terminales de c-Jun (*JNKs : c-Jun N-terminal Kinases*). Ces protéines agissent en phosphorylant une large gamme de facteurs de transcription tel que les c-Jun, ATFs, Elk1 etc... qui à leur tour, changent le profil d'expression de nombreux gènes (*cf. Fig.R-7*). Les SAPKs, en fonction de la gravité du stress jouent ainsi de concert pour, soit stimuler la division cellulaire, soit l'inhiber, ou encore induire l'apoptose.



Le fait que l'anisomycine provoque une relocalisation de TRF2, suggère cette protéine comme un effecteur des SAPKs. Mais par quel moyen des protéines kinases libéreraient-elles TRF2 du nucléole ? L'activation des SAPKs a-t-elle un effet, direct ou indirect, sur la localisation de TRF2 ? TRF2 est-il phosphorylé par un élément des voies SAPKs ? L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des SAPKs permettrait de savoir quelle voie précise de transduction implique TRF2 et par là-même, d'en déterminer des nouveaux partenaires.

Il est aussi intéressant de constater que les effecteurs des SAPKs sont les protéines de la famille c-Jun et ATFs. Les protéines c-Jun peuvent former des homodimères ou hétérodimères avec les protéines c-Fos et ATFs. D'après les résultats du Dr. J.A. CHONG, TRF2 inhibe la transcription du gène c-Fos, événement qui requiert plus de temps pour s'établir que l'activation des protéines c-Jun et ATFs par les SAPKs. Le rôle de TRF2 dans les voies de signalisation contrôlées par les SAPKs serait donc de favoriser la formation graduelle au cours du temps d'hétérodimères Jun-ATF et de réguler ainsi la réponse cellulaire au stress oxydatif.

La position de TRF2 dans la voie des SAPK est-elle néanmoins défendable si l'on considère que TRF2 quitte le nucléole après de 2^H de stress oxydatif, induit par H₂O₂ alors que le même effet est observé 4^H après l'ajout d'anisomycine ? Est ce que cette différence est due à une concentration inadaptée des drogues utilisées, ou, indiquerait-elle que les SAPKs n'influencent qu'indirectement TRF2 ?

← **Figure R-7**

–TRF2 dans les Voies de Signalisations des SAPKs –

Pour répondre à la présence d'éléments capables d'oxyder l'ADN (ROS), les cellules de mammifères ont développé plusieurs voies de signalisation. Une de ces voies est celle des MAPKS :SAPKs. Lorsque les SAPKs sont activées par H₂O₂ ou de l'anisomycine, TRF2 est également relocalisé du nucléole vers le nucléoplasme. Ces événements serait-il liés ? L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MARKs pourrait nous le dire. Quoiqu'il en soit la sortie de TRF2 du nucléole réprime l'expression du gène c-Fos dans les cellules HEK-293. Le produit du gène c-Fos peut interagir avec l'un des effecteurs des SAPKs : Jun. La mobilisation du TRF2 nucléolaire prive donc Jun de l'un de ses partenaires.

II

ANALYSE STRUCTURE-FONCTION de TBP *in vivo*

II ANALYSE STRUCTURE-FONCTION de TBP *in vivo*.

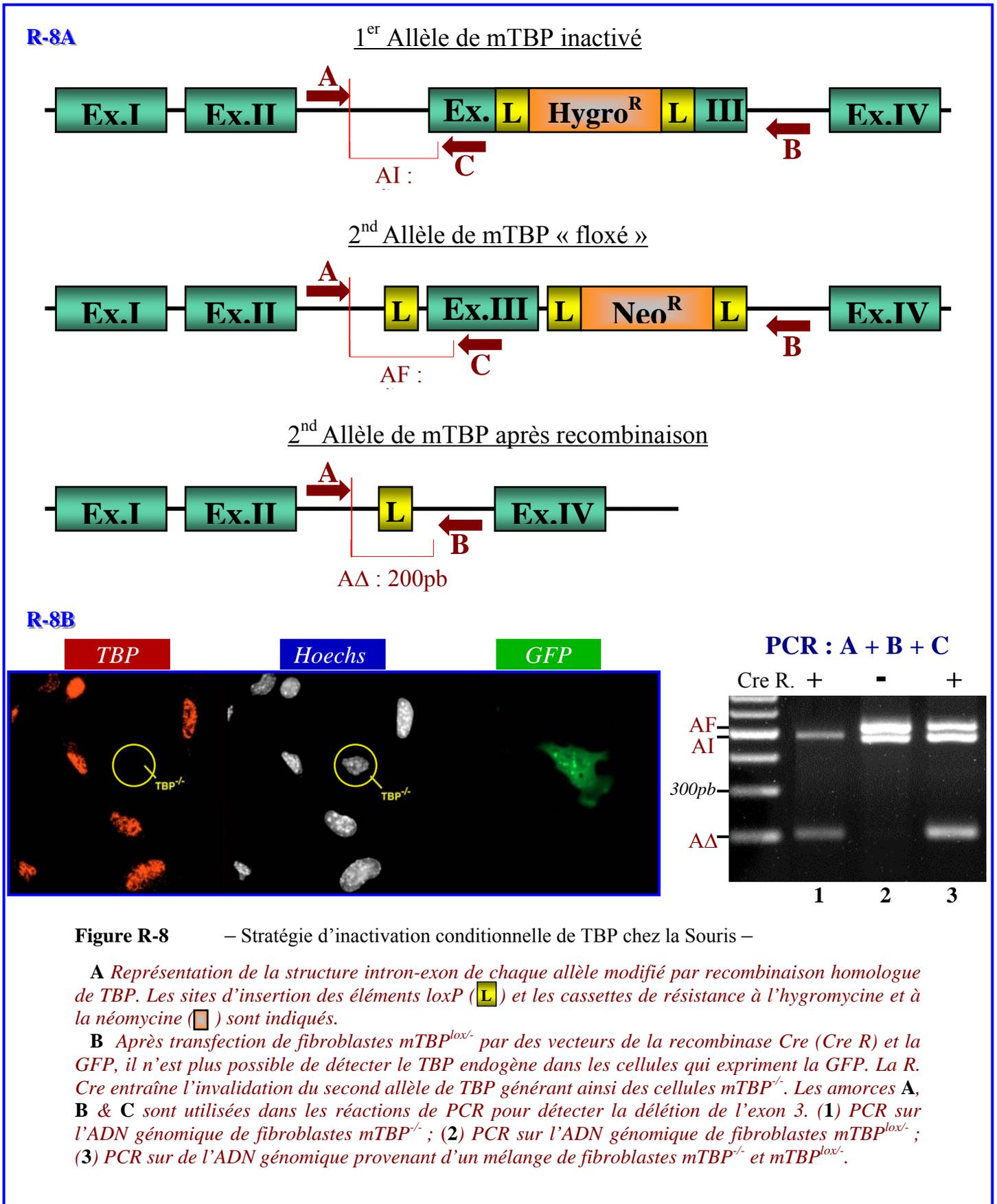
Au cours de ma dernière année de thèse, je me suis attaché à développer un système permettant l'étude *in vivo* de mutants de TBP et en dehors de toute interférence due au TBP endogène. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Marc TIMMERS. (*UMC-Utrecht, Netherlands*). Tous les surnageants viraux nécessaires à cette étude ont été produits par le Dr. Pim PIJNAPPEL.

Au laboratoire, le gène codant pour TBP a été invalidé chez la Souris, par recombinaison homologe classique et conditionnelle. En électroporant des cellules ES par un vecteur portant une partie de la séquence génomique intro/exon de TBP avec une cassette de résistance à l'hygromycine dans son exon III, le Dr. Igor MARTIANOV a pu générer une lignée de souris *tbp*^{+/-}. En croisant ces souris nous avons observé que les embryons *tbp*^{-/-} subissent un arrêt de croissance au stade blastocyste. La perte de TBP provoque un arrêt de la transcription par les ARN polymérases I et III mais non par l'ARN polymérase II (Martianov et al., 2002). Cette observation démontre l'existence d'un mécanisme de transcription par l'ARN polymérase II indépendant de TBP.

Par la suite les cellules ES *tbp*^{+/-} ont été électroporées avec un deuxième vecteur, comportant une partie de la séquence génomique intro/exon de TBP et où des sites loxP ont été introduits de part et d'autre de l'exon III, le Dr. Igor MARTIANOV a ainsi créé une lignée de souris *tbp*^{lox/-}. Des fibroblastes ont été isolés à partir d'embryons *tbp*^{lox/-} puis immortalisés avec l'antigène T du virus SV40.

Dans ces fibroblastes *mtbp*^{lox/-}, la transfection d'un vecteur d'expression de la recombinaise Cre (*Cre R.*) conduit, par excision de l'exon III, à l'inactivation du second allèle de TBP. Cet événement peut être mis en évidence par une stratégie de PCR qui détecte l'allèle délété (*cf. FigR-8*). Dans les cellules *mtbp*^{-/-} ainsi obtenus, des expériences d'immunofluorescence indiquent que TBP disparaît très rapidement. De plus, 8 jours après transfection, nous ne pouvons plus amplifier le fragment correspondant à l'allèle délété. Les cellules *tbp*^{-/-} ne sont donc pas viables et sont rapidement éliminées de la population. Nous avons donc utilisé ce

système afin de savoir si l'expression du TBP humain sauvage (WT) ou de différents mutants du TBP humain pourrait compléter la perte du TBP endogène.



La résolution des structures des complexes TBP-ADN, TBP-TFIIB-ADN, TBP-TFIIA-ADN, TBP-TAF1, TBP-ADN-NC2 et TBP-Brf1 a permis l'identification des acides aminés de TBP impliqués dans ces interactions. La mutagenèse systématique de tous les acides aminés exposés à la surface de TBP a été réalisée dans les équipes du Dr A. BERK, Dr. W. HERR et du Dr. R.H. EBRIGHT (*cf. §III.7-Mutagenèse des Acides Aminées...*). Chaque mutant a été testé pour sa capacité à fixer l'élément TATA du promoteur AdML et à interagir avec TFIIA et TFIIB grâce à des expériences de retard sur gel (*gel mobility shift assays*). Les aptitudes à promouvoir l'activation de la transcription de ces mutants ont été analysées, soit en transfections transitoires dans des cellules Cos avec le vecteur rapporteur de la luciférase couplé au promoteur c-Fos, soit en transcription *in vitro* à partir de deux gènes de classe II ou III (Bryant et al., 1996; Tang et al., 1996; Zhao et al., 2003).

La combinaison de ces résultats a démontré que les interactions de TBP avec TFIIA et TFIIB sont essentielles à l'activité transcriptionnelle *in vitro* ainsi qu'à l'activation de la transcription lors des expériences de transfection transitoire. Ces expériences ont également mis en évidence l'importance de plusieurs autres acides aminés sur la surface de TBP dans l'activation de la transcription (*cf. Tbl III_A et R-B*). Ces acides aminés ne sont impliqués dans aucune interaction avec les facteurs connus, ils pourraient être nécessaires pour l'interaction avec des TAFs, mais cette hypothèse reste encore à vérifier. Toutes ces études de transcription *in vitro* ou de transfection transitoire ont été réalisées avec des activateurs artificiels, tels GAL-VP16 ou GAL-E1A et des promoteurs artificiels. L'effet de chaque mutation, *in vivo*, restait donc à démontrer.

Nous nous sommes focalisés sur des mutants de TBP incapables d'interagir avec NC2 ou B-TAF1 et ceux qui présentent de graves carences dans leur aptitude à initier la transcription par la pol.II. Ces mutants sont dans le contexte *spm3* pour certains ou ont une étiquette flag-HA N-terminale pour d'autres (*cf. Tbl R-B*).

Nous avons d'abord effectué une série de transfections transitoires dans laquelle les cellules *tbp*^{lox/-} étaient cotransfectées par les vecteurs d'expression de la recombinaise Cre, de la GFP et de celui d'un hTBP *spm3* portant ou non des substitutions supplémentaires (*cf. Fig.R-9A*).

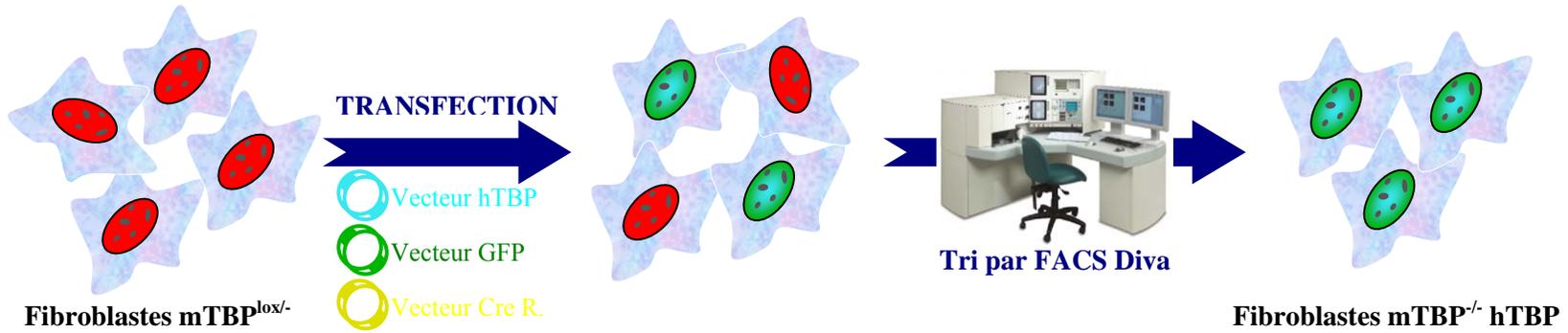
Pour obtenir des fibroblastes exprimant un TBP humain exogène (hTBP) en dehors de toute présence de mTBP endogènes *in vivo*, nous avons adopté une stratégie en deux étapes.

		c-fos	c-fos	β-retinoïc AR	β-retinoïc AR	<i>in vitro</i>	AdML	U1	U6	VAI	TBP	TBP +	TBP +	TBP +	TFIIA	TBP +	TBP +	coIP TBP		résidu	conservé
		GAL4-E1A	GAL4-VP16	GAL4-E1A	GAL4-VP16	<i>Txn</i>	TATA' pol.II	TATA' pol.II	TATA' pol.III	TATA' pol.III	TFIIA	TFIIB	TFIIA&B	column	NC2	BTA1	+ BTA1	contactant			
	spm3	100	100	100	100	100	34±6	95±35	14±4,9	74±13	+	+	+	+	100				spm3		
	flagHA-WT						100	100	100	100	+	+	+	+		+	+	+	WT		
	spm3-V162R	105±24	89±35	92±26	126±54	78±44					+	+	+	+	49				V162		
	flagHA-V162R										-	+	-			+/-	+	-			
H1	spm3-R186E	160	126±23	105±19	113±1	75±42					+	+	+	+	49				R186	Brf1	1
	flagHA-R186E										+	+	-			+/-	+/-	-			
	spm3-R188E	-1±2	1±5	-1±3	-5±9	3±7					-	-	-	-	28±27				R188	Brf1/TFIIA	1 - 3 - 4
	flagHA-R188E						118±11	25±9	37±9	71±15	+	+	+			-	-	+/-			
	spm3-N189E	-1±0	-4±2	-2±1	-4±2	46±8					-	-	+	+	19±8				N189	TFIIA	1 - 2 - 3 - 4
	flagHA-N189E						105±28	8±14	6,1±1,6	33±14											
H2	spm3-R235E	1±0	3±2	6±4	18±2	127±22					-	+	+	+	27±25				R235	Brf1	1 - 2 - 3 - 4
	spm3-V240Q	57±19	69±32	74±10	137±19	115±2					+	+	+	+	64				V240		3
	flagHA-V240A										+/-	+	+/-			+/-	+	+			
	flagHA-Q242A										+	+	+/-			+/-	+	+			1 - 2 - 3
	spm3-P247E	-1±1	-5±1	0±2	10±6	87±72					+	+	+	+	65±18				P247		1 - 3
	spm3-K249E	120±46	92±46	69±21	89±28	62±29					-	+	+	+	31±13				K249	Brf1/BTA1	1 - 3
	flagHA-K249A										-	-	-			-	+/-	-			
S1'	spm3-K254E	97±23	115±17	92±27	99±9	38±10					+	+	+	+	61				K254		1 - 2 - 3
	flagHA-K254A										-	+	-			+	+	+/-			
	spm3-K265E	92±15	75±36	124±35	68±20	59±24					+	+	+	+	58±20				K265		3
	flagHA-K265A										-	+	+/-			+	+	+/-			
H1'	spm3-L270A																		L270		1 - 2 - 3 - 4
	+E271R																		E271	TFIIB	1 - 3 - 4
	spm3-E271R	42±9	46±17	31±12	41±9	49					+	+	+	+	68±23						
	spm3-L275R	71±25	68±19	117±27	109±7	152					+	+	+	+	81				L275	TFIIB	3
	spm3-H277E	110±10	114±14	101±21	85±19	11±25					-	+	+	+	127				H277	NC2β	1 - 3
	spm3-R299E	84±6	96±20	113±16	93±1	68±40					-	+	+	+	56				R299	ADN/NC2β	1 - 2 - 3
	flagHA-R299A						118±11	60±28	125±13	83±16	-	+	+/-			+	+	+			
H2'	spm3-R318E	93±47	137±32	193±28	267±48	77±121					-	+	+	+	67±14				R318	Brf1	1 - 3 - 4
	flagHA-R318A										-	+	-			+	+	+/-			
	spm3-Δ7Ct																		7Ct	NC2β	
	puromycine R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	puro.R		

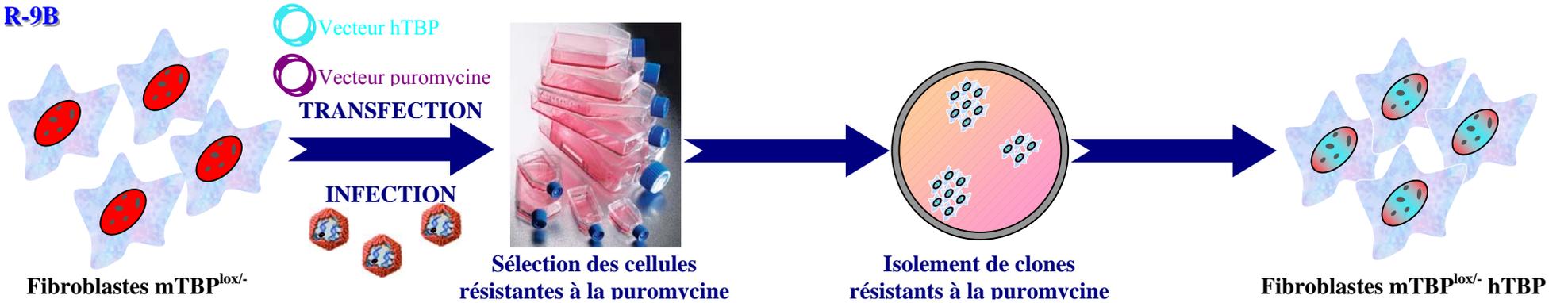
Tableau R-B – Synthèse des Caractéristiques *in vitro* des Mutants Etudiés –

Dans ce tableau sont résumés les résultats d'études antérieures *in vitro* obtenus avec les mutants de TBP que nous avons exprimés dans les fibroblastes murins (notés dans la colonne de gauche sur fond bleu). Dans ces colonnes, on retrouve les données déjà présentées dans le tableau III-A (cf. §III.7-Mutagène des Acides...). Ainsi que la capacité de certains mutants à transcrire *in vitro* les gènes adénovirus AdML et VAI ; et ceux des snARNs U1 et U6 d'après (Zhao et al., 2003). Sont également présentés ici les résultats obtenus par nos collaborateurs de l'UMC d'Utrecht. Ces résultats décrivent les interactions *in vitro* des mutants de TBP ayant une étiquette flag-HA avec l'élément TATA (12°colonne), TFIIA (13°colonne), TFIIB (14°colonne), NC2 (17°colonne), BTA1 (18°colonne). Dans la colonne 19 est indiqué s'il a été possible de détecter BTA1 en immunoprécipitant le TBP muté.

R-9A



R-9B



R-9C



← Figure R-9

– Procédures Expérimentales –

Sur cette figure sont schématisées les différentes étapes que nous avons suivies pour exprimer des protéines TBP humaines sauvages ou mutées dans des fibroblastes murins en absence du TBP endogène.

Dans un premier temps, nous avons généré des lignées de fibroblastes *mtbp*^{lox/-} exprimant de manière stable la protéine TBP humaine, sauvage ou mutée. Pour ce faire, nous avons eu recours soit à des cotransfections de plasmides d'expression du gène de résistance à la puromycine et du hTBP d'intérêt, soit à des infections de rétrovirus murins de la leucémie de Moloney (*MMuLV* : *Moloney Murine Leukaemia Virus*) permettant l'intégration dans le génome de la cellule hôte d'une cassette d'expression du TBP d'intérêt (*cf. Fig.R-9B*).

Dans un deuxième temps, les cellules *mtbp*^{lox/-} exprimant de manière constitutive une protéine hTBP sauvage ou mutée, ont été cotransfectées avec des plasmides d'expression de la GFP et de la recombinaise Cre. Les cellules produisant la GFP ont ensuite été concentrées par cytométrie en flux (*FACS* : *Fluorescence Activated Cell Sorter*) et des clones qui expriment les TBP humains exogènes en absence de TBP murin endogène ont pu être isolés (*cf. Fig.R-9C*).

2.1) Etude Préliminaire par Transfections Transitoires

Afin d'évaluer le potentiel qu'offrent les fibroblastes *tbp*^{lox/-} pour évaluer l'impact des mutations de TBP sur la viabilité cellulaire, nous avons entrepris une série de cotransfections visant à exprimer un TBP humain sauvage ou muté dans ces fibroblastes tout en inactivant simultanément le second allèle du TBP endogène. Dans cette série d'expériences, tous les mutants étudiés sont placés dans un contexte *spm3*, ceci est important puisque cela nous permet de comparer directement les résultats *in vitro* de l'étude du Dr. G.O. BRYANT avec les nôtres.

Pour ce faire nous avons cotransfecté, à l'aide de fugène, $1,5 \times 10^6$ fibroblastes à 95% de confluence avec 1µg de vecteur d'expression de la GFP, 5µg de vecteur de la recombinaise Cre et 5µg de vecteur codant un TBP humain, muté ou non. Dans ces conditions il est probable que la majorité des cellules exprimant la GFP aura été transfectée par les trois vecteurs à la fois. Les fibroblastes qui expriment la GFP, 24^H après transfection, sont isolés par un FACS Diva (*Becton, Dickinson*). Ces cellules sont aliquotées en cinq fractions et remises en culture. Ce qui permet, pour une même population d'analyser en PCR l'ADN génomique à différents temps de transfection.

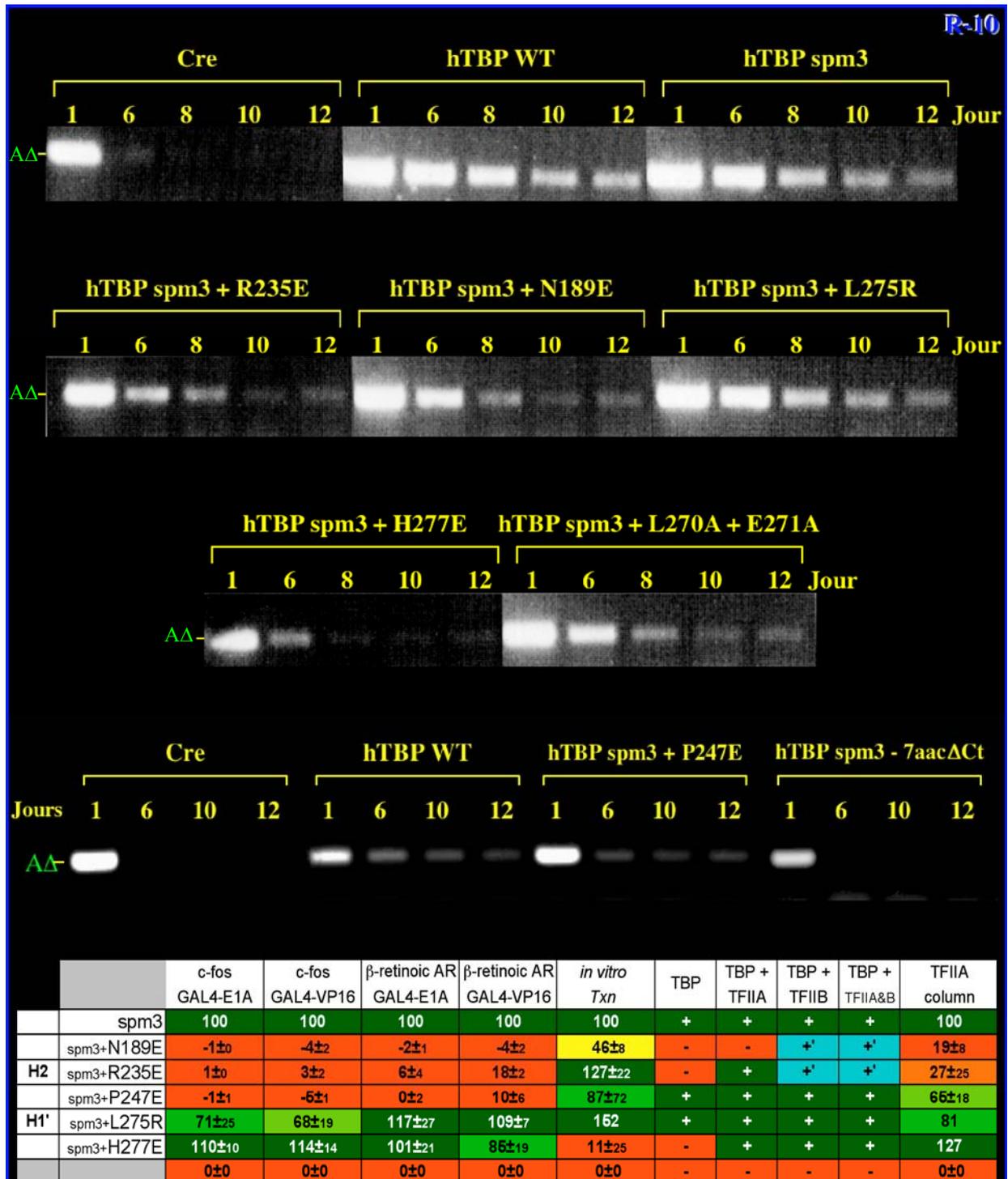


Figure R-10 – Etude de Complémentation Par Transfections Transitoires –

*L'amplification du fragment AA par PCR est le témoignage direct de la recombinaison de l'allèle « floxé » de TBP par la recombinase Cre. Tant que ce fragment est détectable les fibroblastes *mtbp*^{-/-} sont viables aux nombres de jours indiqués après le tri. Comme le montre ces gels, la capacité de chaque mutant à compléter la perte du TBP endogène n'a pas de lien évident avec ses caractéristiques *in vitro*, rappelées dans le tableau ci-dessus.*

Dans la population de fibroblastes transfectés avec la recombinaise Cre seule, les cellules porteuses de l'allèle délété disparaissent rapidement car le fragment AΔ est difficilement détectable 6 jours après le tri (*cf. Fig.R-10*).

Le fragment AΔ peut par contre être détecté 12 à 14 jours après transfection lorsque les fibroblastes *tbp*^{lox/-} sont cotransfectés avec les vecteurs d'expression de la recombinaise Cre et du TBP humain sauvage, ce qui semble indiquer que les cellules *tbp*^{-/-} sont viables et persistent dans la population. Les mêmes résultats ont été observés avec le mutant TBP *spm3*, ce mutant pourrait donc compléter la perte du TBP murin de la même façon que le TBP humain sauvage.

Les mutations *spm3*+L275R et *spm3*+P247E du TBP humain ne paraissent pas affecter la viabilité cellulaire, en revanche comme le montre la faible amplification de AΔ après 6 jours les mutants hTBP *spm3*+H277E et hTBP *spm3*+Δ7Ct sont moins efficaces à compléter la perte du TBP endogène.

Des résultats intermédiaires ont été obtenus avec les mutants hTBP [*spm3*+N189E / *spm3*+R235H / *spm3*+L270A+E271A]. Le fragment AΔ est toujours amplifié 12 jours après transfection, mais l'amplitude de son signal décroît fortement au cours du temps. Cela semblerait indiquer que ces mutants puissent compléter dans une certaine mesure la perte du TBP endogène mais que la viabilité des cellules exprimant ces mutants est réduite.

En comparant les effets d'une même mutation de TBP, *in vitro* (Bryant et al., 1996) et *in vivo*, il apparaîtrait qu'il n'existe pas de corrélation entre la capacité à promouvoir la transactivation dans les expériences de transfection transitoire et celle de compléter la perte du TBP endogène (*voir par exemple R235E*). Le mutant hTBP *spm3*+N189E est incapable de promouvoir la transactivation *in vivo* mais garde une activité de base dans les réactions de transcription *in vitro*. Il semblerait que le phénotype produit par cette substitution, dans les fibroblastes *mtbp*^{-/-}, ne soit pas aussi sévère que ne le laisse envisager les conclusions de ces études.

2.2) Elaboration de Transfectants Stables *mtbp*^{lox/-} pour hTBP

Si la méthode de cotransfection transitoire des fibroblastes *mtbp*^{lox/-} a fait ses preuves pour déterminer l'impact de mutations ponctuelles de TBP sur la viabilité cellulaire, elle n'en présente pas moins un inconvénient majeur. Même si la recombinaison génomique se

transmet de cellule mère en cellules filles, l'expression du TBP exogène, elle, ne se maintient pas dans le temps. Et comme un tri n'est jamais efficace à 100%, au fur et à mesure des générations, les cellules hétérozygotes pour le TBP endogène supplantent les cellules *mtbp*^{-/-}, surtout si ces dernières expriment une mutation du TBP exogène qui affecte la prolifération cellulaire. Pour contourner ces problèmes et mener des études physiologiques à long terme sur une population de fibroblastes exclusivement *mtbp*^{-/-}, nous avons établi des lignées de fibroblastes murins *mtbp*^{lox/-} qui expriment de manière constitutive un TBP d'intérêt.

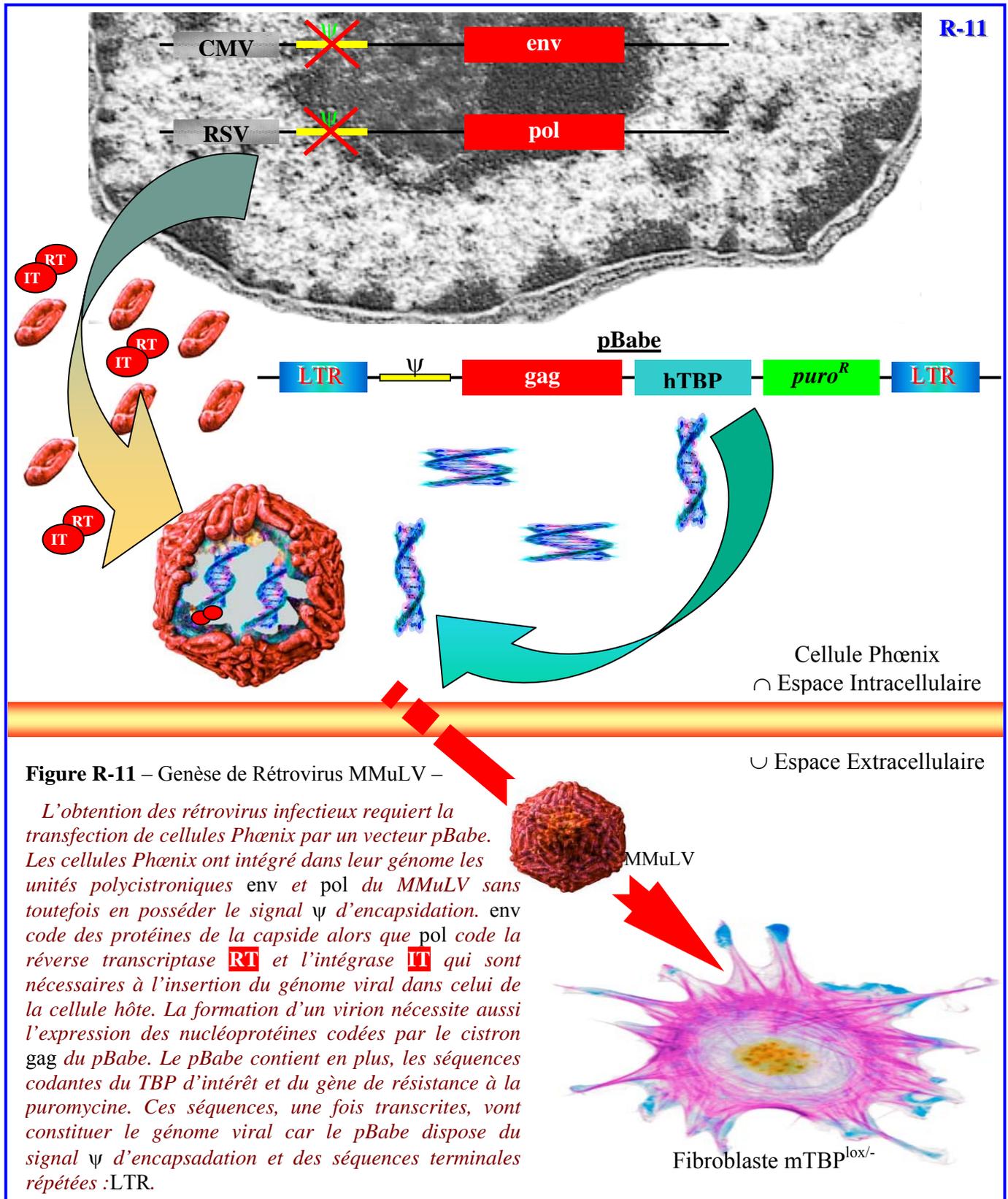
Nous avons ici utilisé deux méthodes. La première consiste à cotransfecter dans les fibroblastes *mtbp*^{lox/-}, 1µg de plasmide d'expression du gène de résistance à la puromycine avec 5µg de vecteur du TBP humain, sauvage ou muté.

La seconde fait appel à des rétrovirus MMuLV permettant l'intégration d'une cassette d'expression de TBP produit dans le système phœnix écotropique par le Dr. Pim PIJNAPPEL. L'élément viral de ces vecteurs comprend le signal d'encapsidation « ψ », les séquences répétées terminales (*LTR : Long Terminal Repeat*) nécessaires à la réverse-transcription du génome viral et à son intégration dans celui de la cellule hôte, ainsi que la région codante pour le groupe antigénique de nucléoprotéines (*GAG : Group Antigens*). Le reste du génome viral a été remplacé par les séquences codantes du gène de résistance à la puromycine et du TBP d'intérêt (*cf. Fig.R-11*).

24h après transfection ou infection des fibroblastes murins *mtbp*^{lox/-}, le milieu de culture est complété par 3µg/ml en puromycine. Seules survivent alors des cellules isolées qui expriment de manière stable le gène de résistance à la puromycine. Les transfectants après une dizaine de jours de culture, forment des colonies observables à l'œil nu. Chaque clone est isolé puis amplifié. L'expression du hTBP exogène dans les extraits protéiques totaux de chaque clone est vérifiée par Western blot. Il est important de remarquer que malgré des masses moléculaires très proches, les mobilités électrophorétiques des TBPs murin et humain diffèrent. Les masses moléculaires apparentes par électrophorèse en conditions dénaturantes (*SDS page*) sont d'environ 35kDa pour le TBP murin et d'environ 49kDa pour le TBP humain (*cf. Fig.R-12*).

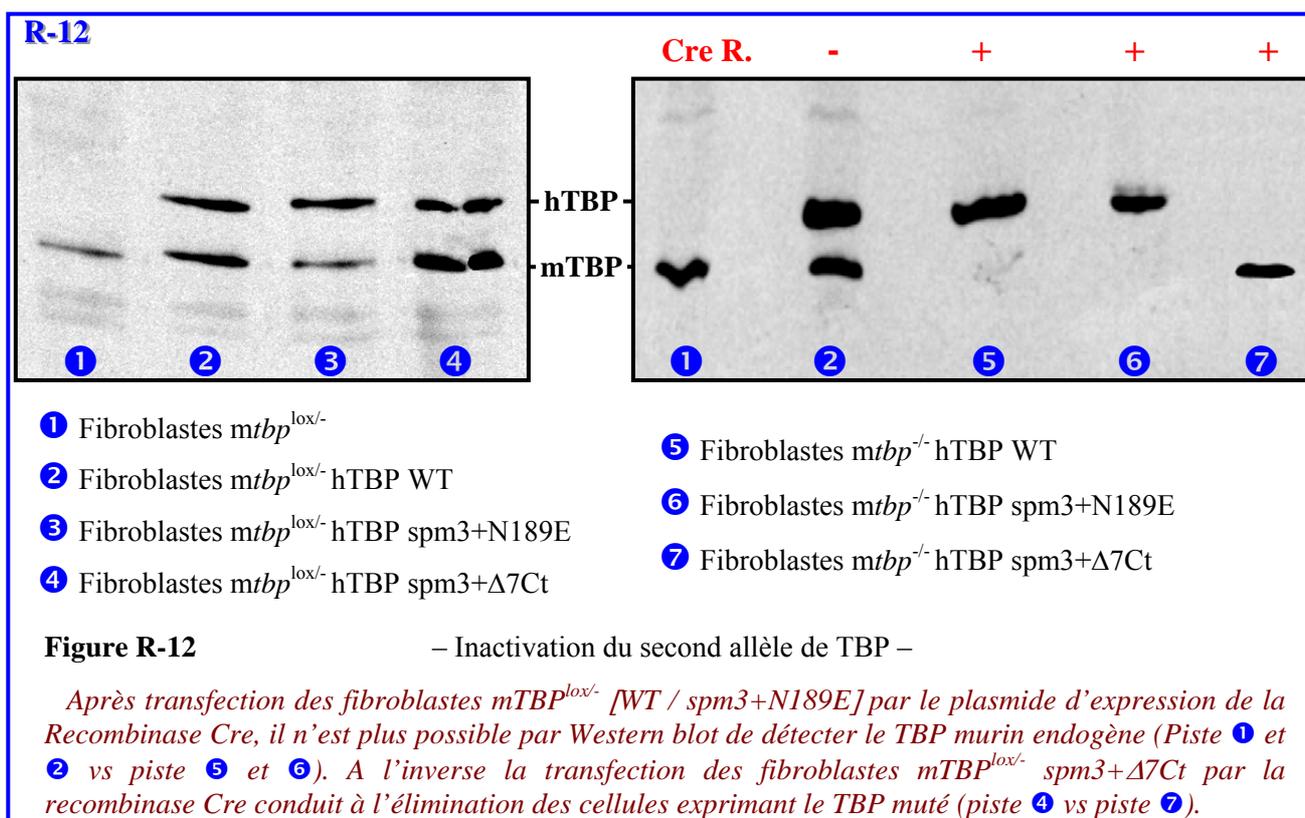
Des lignées stables ont été obtenues pour les formes du TBP humain : sauvage, spm3+N189E, spm3+Δ7Ct (par cotransfection) (*cf. Fig.R-12*) et pour les mutants : flagHA-hTBP [WT / V162R / R186E / R188E / Q240A / Q242A / K249A / K254A / K265A / R318A] (par infection), ce qui montre que ces mutations n'ont pas d'effet dominant négatif. A l'inverse nous n'avons pu réussir à établir des lignées stables pour les mutants hTBP spm3,

spm3+P247E, spm3+L275R, spm3+H277E et spm3+L270A+E271A (par cotransfection). On ne peut néanmoins conclure que ces mutants sont des dominants négatifs car les expériences de transfection transitoire ont montré que le mutant hTBP spm3+L275R semble capable de compléter la perte du mTBP endogène.



2.3) Elimination du TBP endogène.

Pour inactiver le second allèle de mTBP de ces cellules, nous les avons transfectées avec un vecteur de la recombinaise Cre et un vecteur de la GFP dans un rapport de 5/1. 24^H après transfection les cellules qui expriment la GFP ont été isolées par FACS et mises en culture pendant 7 jours. L'absence de mTBP dans ces cellules a été vérifié par Western blot. A l'exception des transfectants pour le mutant hTBP *spm3*+ Δ 7Ct, il n'est plus possible de détecter la protéine mTBP (*cf. Fig.R-12*).



Par la suite ces cultures ont été fortement diluées afin d'isoler une cellule et d'obtenir à terme, par expansion des populations homogènes. Nous avons pu ainsi isoler des clones pour onze lignées *mtbp*^{-/-}, infectées par les formes de flagHA-hTBP suivantes : sauvage, V162R, R186E, R188E, V240A, Q242A, K249A, K254A, K265A, K299A, R318A. Le géotypage par PCR démontre que seules persistent des cellules *mtbp*^{-/-} dans ces clones. Ceci est confirmé par Western blot par le fait qu'aucune de ces lignées n'expriment le TBP murin (*cf. fig.R-13*). Le hTBP WT, V162R, V240A, K249A, K265A et R318A présente néanmoins un clivage protéolytique de l'étiquette flagHA sans que l'on sache encore quel en est la signification biologique.

Pour l'instant aucun clone *mtbp*^{-/-} hTBP *spm3*+N189E n'a encore été isolé, faute de temps.

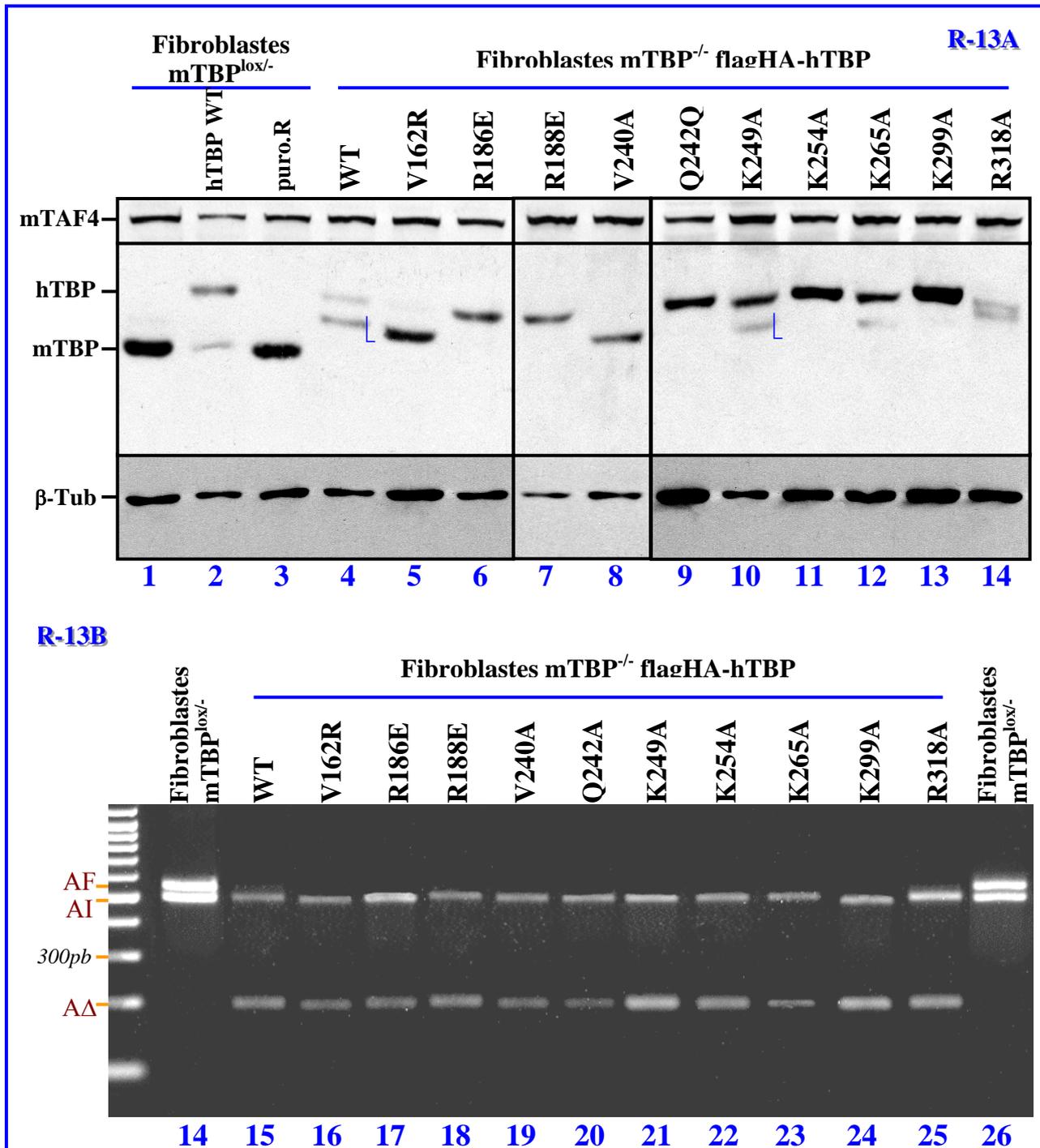


Figure R-13 – Fibroblastes $mTBP^{-/-}$ Exprimant de Manière Stable un TBP Exogène Sauvage ou Muté –

A Par Western blot, le mTBP endogène est uniquement détectable dans les lignées de fibroblastes $mTBP^{lox/-}$ (piste 1), de fibroblastes $mTBP^{lox/-}$ hTBPWT (piste 2) et fibroblastes $mTBP^{lox/-}$ infectés par un pBabe ne contenant pas de séquence codante pour TBP (piste 3). Dans les lignées isolées après invalidation du second allèle de mTBP, seul le TBP exogène est détectable. Son expression dans chaque lignée varie peu si l'on considère celle de la β -tubuline et du TAF4. Il semblerait toutefois que les étiquettes flagHA (L) des hTBP sauvage (piste 4), V162R (piste 5), V240A (piste 8), K249A (piste 10), K265A (piste 12) et R318A (piste 14) soient particulièrement labiles.

B L'utilisation des amorces A, B et C en PCR avec de l'ADN génomique de chaque lignée, confirme que l'exon 3 a bien été recombiné car le fragment AA est amplifié. Les lignées $mTBP^{-/-}$ sont absentes de toute contamination par des cellules $mTBP^{lox/-}$, car, en plus de AA seul le fragment AI est amplifié et non le fragment AF.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

2.4) Des Résultats Préliminaires Déroutants.

Pour évaluer l'impact de chaque mutation de TBP sur la prolifération cellulaire nous avons effectué des courbes de croissance en mettant en culture quatre fractions de 10000 cellules provenant d'un clone de chaque lignée. Ce qui permet, pour une même population, de compter le nombre de cellules à différents jours de culture.

Les fibroblastes $mtbp^{lox/-}$ hTBP WT et $mtbp^{-/-}$ hTBP WT ont un taux de prolifération significativement supérieur à celui des cellules $mtbp^{lox/-}$, comme l'attestent nos courbes de croissance (cf. Fig.R-14). Il a déjà été montré qu'une telle augmentation pouvait résulter de la surexpression de TBP (Johnson et al., 2003; Zhong et al., 2004). Nos Westerns blots indiquent néanmoins que les taux d'expression des TBPs exogènes ne sont pas supérieurs à celui du TBP endogène des fibroblastes $mtbp^{lox/-}$ (cf. Fig.R-13). Le TBP exogène est transcrit *via* un transgène intégré au hasard dans le génome et n'est donc pas dans un environnement identique à celui des gènes du TBP murin. De ce fait la régulation de l'expression du transgène au cours du cycle cellulaire diffère de celle contrôlant la transcription du TBP endogène, ce qui pourrait expliquer les variations observées.

R-14

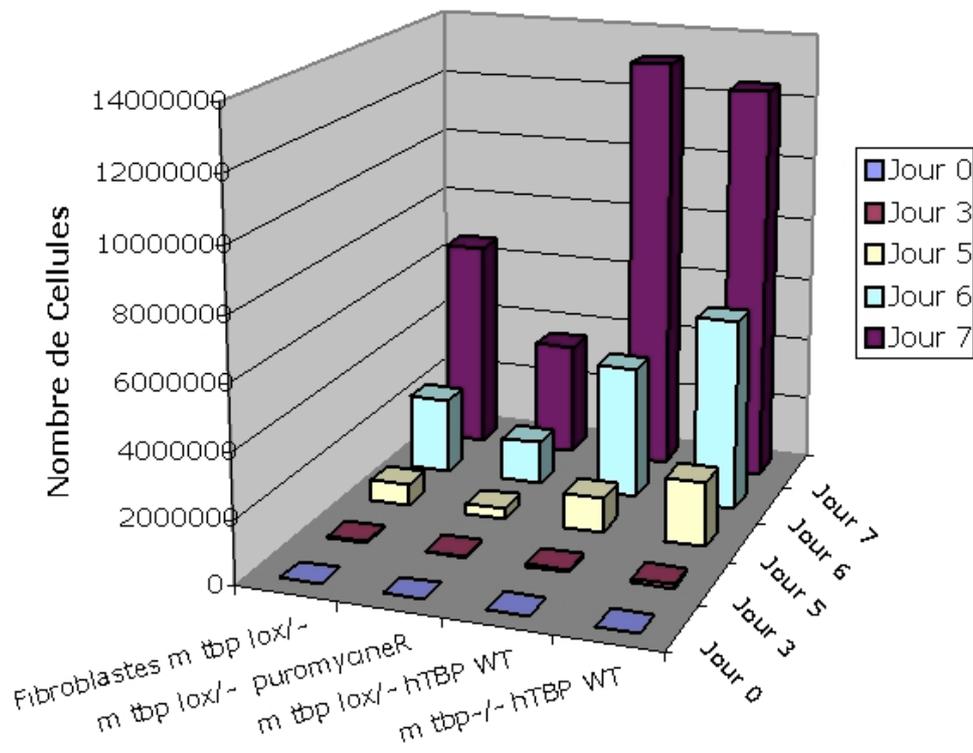


Figure R-14 – Analyse de la Prolifération Cellulaire : Lignées Contrôles –

Pour chaque clone 10000 cellules ont été mises en culture dans 4 boîtes de pétri (Jour 0). Les cellules de la première boîte ont été comptées après 3 jours de culture, ceux de la seconde boîte après 5 jours de culture et ainsi de suite. Nous avons évalué ainsi, pour une même population, sa prolifération.

Les cellules *mtbp*^{-/-} hTBP R299A ont une prolifération identique aux fibroblastes *mtbp*^{-/-} hTBP WT (cf. FigR-16). L'arginine 299 n'interviendrait donc pas dans les fonctions de TBP impliquées dans le métabolisme cellulaire. La substitution R299A n'a d'ailleurs pas été identifiée comme altérant la capacité de TBP à lier TFIIA et TFIIB (Tang et al., 1996).

La prolifération cellulaire des lignées *mtbp*^{-/-} hTBP [V162R / V240A / Q242A / K254A / K265A / R318A] est quant à elle affectée, ces lignées ont un taux de prolifération inférieur à celui des fibroblastes murins *tbp*^{lox/-} ou *tbp*^{-/-} hTBP WT. Les résidus correspondants auraient de ce fait, un rôle plus complexe que celui envisagé suite aux études *in vitro*, où ces mutants n'ont eu que peu d'effet.

A l'inverse, les fibroblastes *mtbp*^{-/-} exprimant le hTBP R186E présentent une hyperprolifération par rapport à la lignée *tbp*^{-/-} hTBP WT. Cette hyperprolifération est d'autant plus étonnante, que le résidu R186 de TBP forme un pont salin avec le résidu E477 de Brf1 (Juo et al., 2003). Une telle mutation est sensée altérer la transcription par la pol.III, nos résultats remettent en question cette attestation.

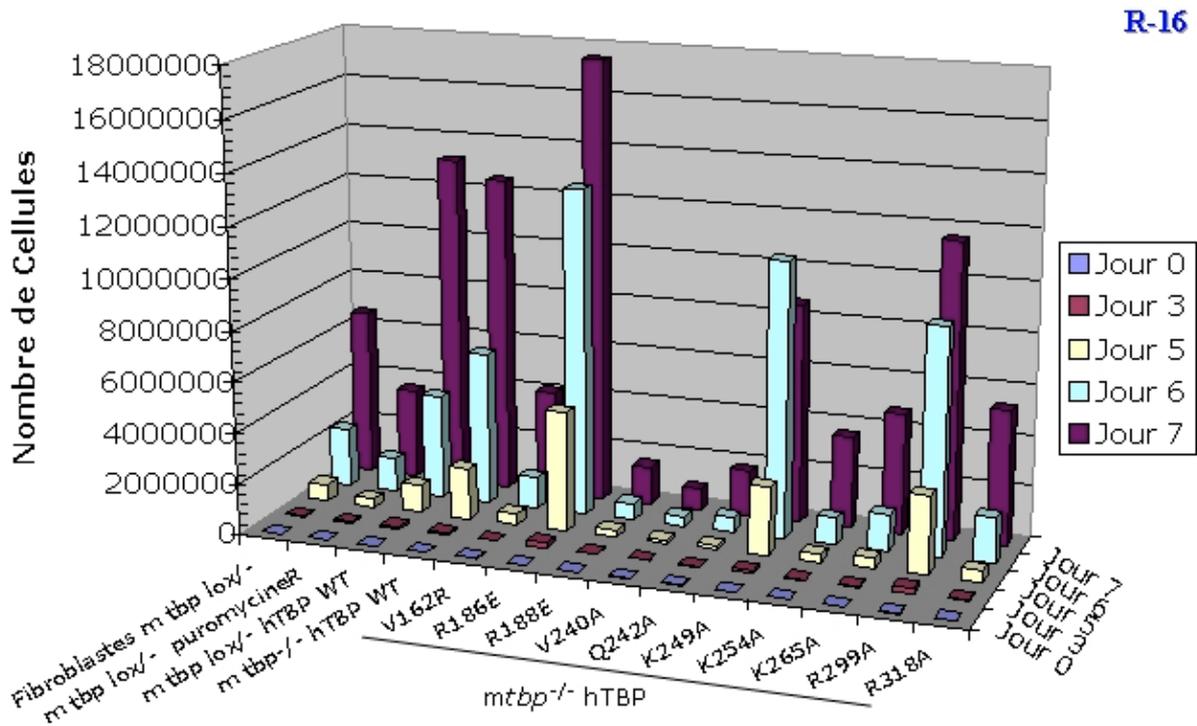


Figure R-16 – Analyse de la Prolifération Cellulaire des Lignées privées de TBP Endogène –
Nous avons étudié la prolifération d'un clone de chaque lignée de fibroblastes mTBP^{-/-} exprimant un TBP humain exogène muté ou non.

La mutation R188E dans un contexte *spm3* porte atteinte à l'intégrité structurale du TBP. *In vitro*, nos collaborateurs néerlandais ont observé que ce mutant ne peut former un complexe stable avec NC2 et BTAF1 (*cf. Tbl.R-B*). Le mutant hTBP R188E manifeste de plus une aptitude réduite à initier la transcription à partir soit du promoteur de classe II TATA-indépendant du snARN U1 soit du promoteur de classe III type III du snARN U6. Ce mutant peut cependant supporter la transcription de la pol.II sur le promoteur AdML. (Zhao et al., 2003). Etant donné les effets *in vitro* de cette substitution, l'obtention de lignées stables *mtbp*^{-/-} hTBP R188E est surprenante ; le fait que leurs taux de prolifération soient faibles est néanmoins en accord avec les analyses *in vitro*.

Comme nous l'avons vu précédemment, 24^h après transfection des cellules *mtbp*^{lox/-} hTBP *spm3*+N189E par les vecteurs de la recombinaise Cre et la GFP, les cellules exprimant la GFP ont été isolées par FACS. Cette population est composée en majorité de cellules *mtbp*^{-/-} hTBP *spm3*+N189E (>95%). Après 7 jours de culture, la protéine mTBP endogène n'est pas détectable en Western blot (*cf. Fig.R-13*) et le fragment AΔ est toujours amplifiable par PCR après 15 jours de culture. Cela signifie que ce mutant est viable. Des études *in vitro* montrent pourtant que ce mutant présente de graves inaptitudes à soutenir les processus transcriptionnelles de la pol.II et III (Bryant et al., 1996; Zhao et al., 2003). La viabilité des cellules *mtbp*^{-/-} hTBP *spm3*+N189E est donc tout à fait inattendue. Ce résultat reste à confirmer en isolant des clones homogènes *mtbp*^{-/-} hTBP *spm3*+N189E.

Le mutant hTBP K249A est décrit *in vitro* par nos collaborateurs comme incapable d'interagir avec l'élément TATA, ou les facteurs TFIIA, TFIIB et NC2 (*cf. Tbl.R-B*). Les cellules *mtbp*^{-/-} hTBP K249A sont néanmoins viables et ont un taux de prolifération supérieur à celui des cellules *mtbp*^{-/-} hTBP WT. Ces cellules présentent toutefois un phénotype particulier puisqu'elles meurent lorsque leur densité arrive à environ 60% de confluence. Les simples études d'expression protéique et de prolifération cellulaire que nous avons réalisées ne nous permettent pas d'expliquer ce phénomène.

L'élimination des sept résidus C-terminaux de TBP semble être délétère pour les fibroblastes puisqu'en dépit de nombreux essais, nous avons été incapables de générer des cellules *mtbp*^{-/-} hTBPΔ7Ct. Parmi les sept résidus – K₃₃₃ G₃₃₄ F₃₃₅ R₃₃₆ K₃₃₇ T₃₃₈ T₃₃₉ –, les deux premiers participent à la formation du complexe TBP/NC2 mais cela est insuffisant pour expliquer un tel phénotype. Le motif – F R K – est conservé de la Levure à l'Homme pour TBP comme pour TRF1 et 3. Malgré cela, sa fonction n'a pas encore été déterminée et les mutants de TBP portant l'une des substitutions K333E, G334R, R336E, ou T338R ont tous *in*

vitro, une activité transcriptionnelle proche du TBP sauvage (cf. Fig.III.1 §III.7 Mutagenèse des Acides Aminées...).

Nos résultats ne montrent pas de lien évident entre les effets *in vitro*, d'une mutation de TBP et ses répercussions *in vivo*. Tous au plus on peut remarquer que le mutant hTBP R188E, décrit dans la littérature comme incapable de participer aux mécanismes de transcription de la pol.II et III, réduit significativement le taux de prolifération des fibroblastes dans lesquels il est exprimé. Les études *in vitro* ont caractérisé les interactions de TBP et de chacun de ses partenaires au niveau moléculaire. Ceci a permis de définir les surfaces de contact de TBP et de caractériser les mutations qui perturbent l'association de cette protéine avec ses partenaires. Les études *in vitro* ne peuvent néanmoins rendre compte d'un environnement aussi complexe que celui d'un noyau eucaryote. Bien que certaines des mutations que nous avons étudiées affectent les interactions entre TBP et ses partenaires, on ne peut exclure que les effets délétères de ces mutations soient compensés *in vivo*.

L'embryon d'étude qui a été réalisé jusqu'à présent démontre que notre système d'inactivation conditionnelle de TBP dans des fibroblastes murins se révèle parfaitement adapté à l'étude des liens entre la structure et les fonctions physiologiques de cette protéine. Par la suite, des immunoprécipitations du TBP humain sauvage ou muté, exprimé dans les fibroblastes *mtbp*^{-/-}, nous permettront d'évaluer l'impact de chaque mutation de TBP sur l'intégrité du TFIID et sa capacité à interagir avec ses partenaires. Le comportement de chaque mutant au cours du cycle cellulaire sera analysé par immunohistochimie, CFSE et coloration de l'ADN à l'iodure de propidium. Les effets des mutations correspondantes sur la physiologie cellulaire seront étudiés comme ceux de n'importe quelle autre protéine endogène, puisque le transgène est la seule source de TBP dans ces cellules. Les variations de comportement entre les fibroblastes *mtbp*^{-/-} hTBP WT et les fibroblastes *mtbp*^{-/-} exprimant un TBP humain muté, suite à l'exposition d'une drogue, d'un stress etc... seront donc directement liées à la présence de cette mutation. L'utilisation de ces fibroblastes *mtbp*^{lox/-} pour décrypter les mécanismes qui impliquent TBP *in vivo* laisse entrevoir de prometteuses perspectives.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE**- A -**

- Abbott, K. L., Renfrow, M. B., Chalmers, M. J., Nguyen, B. D., Marshall, A. G., Legault, P. and Omichinski, J. G.** (2005). Enhanced Binding of RNAP II CTD Phosphatase FCP1 to RAP74 Following CK2 Phosphorylation. *Biochemistry* **44**, 2732-2745.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L.** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A. I.** (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**, 1-11.
- Andrau, J. C., Van Oevelen, C. J., Van Teeffelen, H. A., Weil, P. A., Holstege, F. C. and Timmers, H. T.** (2002). Mot1p is essential for TBP recruitment to selected promoters during in vivo gene activation. *Embo J* **21**, 5173-83.
- Antequera, F. and Bird, A.** (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11995-9.
- Apone, L. M., Virbasius, C. M., Reese, J. C. and Green, M. R.** (1996). Yeast TAF(II)90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev* **10**, 2368-80.
- Armache, K. J., Kettenberger, H. and Cramer, P.** (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6964-8.
- Armache, K. J., Kettenberger, H. and Cramer, P.** (2005a). The dynamic machinery of mRNA elongation. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 197-203.
- Armache, K. J., Mitterweger, S., Meinhart, A. and Cramer, P.** (2005b). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* **280**, 7131-4.
- Arndt, K. M., Ricupero-Hovasse, S. and Winston, F.** (1995). TBP mutants defective in activated transcription in vivo. *Embo J* **14**, 1490-7.
- Arndt, K. M., Wobbe, C. R., Ricupero-Hovasse, S., Struhl, K. and Winston, F.** (1994). Equivalent mutations in the two repeats of yeast TATA-binding protein confer distinct TATA recognition specificities. *Mol Cell Biol* **14**, 3719-28.
- Auble, D. T. and Hahn, S.** (1993). An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes Dev* **7**, 844-56.

- B -

- Bartfai, R., Balduf, C., Hilton, T., Rathmann, Y., Hadzhiev, Y., Tora, L., Orban, L. and Muller, F.** (2004). TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr Biol* **14**, 593-8.
- Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R. and Corden, J. L.** (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **8**, 330-9.
- Batalova, F. M., Stepanova, I. S., Skovorodkin, I. N., Bogolyubov, D. S. and Parfenov, V. N.** (2005). Identification and dynamics of Cajal bodies in relation to karyosphere formation in scorpionfly oocytes. *Chromosoma* **113**, 428-39.
- Bazett-Jones, D. P., Leblanc, B., Herfort, M. and Moss, T.** (1994). Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**, 1134-7.

- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W. and Medalia, O.** (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**, 1387-90.
- Bell, S. D. and Jackson, S. P.** (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol* **4**, 208-13.
- Birck, C., Poch, O., Romier, C., Ruff, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Davidson, I. and Moras, D.** (1998). Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family. *Cell* **94**, 239-49.
- Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W. and Azizkhan, J. C.** (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* **10**, 6632-41.
- Bleichenbacher, M., Tan, S. and Richmond, T. J.** (2003). Novel interactions between the components of human and yeast TFIIA/TBP/DNA complexes. *J Mol Biol* **332**, 783-93.
- Bogenhagen, D. F., Sakonju, S. and Brown, D. D.** (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* **19**, 27-35.
- Bourbon, H. M., Aguilera, A., Ansari, A. Z., Asturias, F. J., Berk, A. J., Bjorklund, S., Blackwell, T. K., Borggreffe, T., Carey, M., Carlson, M. et al.** (2004). A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* **14**, 553-7.
- Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L. and Schultz, P.** (1999). Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFIIIC. *Science* **286**, 2151-3.
- Brasch, K. and Ochs, R. L.** (1992). Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. *Exp Cell Res* **202**, 211-23.
- Breathnach, R. and Chambon, P.** (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**, 349-83.
- Briand, J. F., Navarro, F., Gadal, O. and Thuriaux, P.** (2001). Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 189-95.
- Bryant, G. O., Martel, L. S., Burley, S. K. and Berk, A. J.** (1996). Radical mutations reveal TATA-box binding protein surfaces required for activated transcription in vivo. *Genes Dev* **10**, 2491-504.
- Bulger, M. and Groudine, M.** (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* **13**, 2465-77.
- Buratowski, S.** (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**, 679-80.
- Buratowski, S. and Zhou, H.** (1992). Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA. *Science* **255**, 1130-2.
- Burley, S. K. and Roeder, R. G.** (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* **65**, 769-99.
- Burton, Z. F., Killeen, M., Sopta, M., Ortolan, L. G. and Greenblatt, J.** (1988). RAP30/74: a general initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **8**, 1602-13.
- Bushnell, D. A. and Kornberg, R. D.** (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6969-73.

- C -

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**, E107-12.

Catena, R., Argentini, M., Martianov, I., Parello, C., Brancorsini, S., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. and Davidson, I. (2005). Proteolytic cleavage of ALF into alpha- and beta-subunits that form homologous and heterologous complexes with somatic TFIIA and TRF2 in male germ cells. *FEBS Lett* **579**, 3401-10.

Chadick, J. Z. and Asturias, F. J. (2005). Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem Sci* **30**, 264-71.

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**, 4835-45.

Chasman, D. I., Flaherty, K. M., Sharp, P. A. and Kornberg, R. D. (1993). Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8174-8.

Chen, J., Laroche, S., Li, X. and Suter, B. (2003). Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* **424**, 228-32.

Chen, Z. and Manley, J. L. (2000). Robust mRNA transcription in chicken DT40 cells depleted of TAF(II)31 suggests both functional degeneracy and evolutionary divergence. *Mol Cell Biol* **20**, 5064-76.

Chong, J. A., Moran, M. M., Teichmann, M., Kaczmarek, J. S., Roeder, R. and Clapham, D. E. (2005). TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol Cell Biol* **25**, 2632-43.

Ciliberto, G., Rauegi, G., Costanzo, F., Dente, L. and Cortese, R. (1983). Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase iii. *Cell* **32**, 725-33.

Cioce, M. and Lamond, A. I. (2004). Cajal Bodies: A Long History of Discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Coin, F. and Egly, J. M. (1998). Ten years of TFIIH. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 105-10.

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**, 904-8.

Coulombe, B. and Burton, Z. F. (1999). DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 457-78.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 218-26.

Cramer, P., Bushnell, D. A. and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* **292**, 1863-76.

Crowley, T. E., Hoey, T., Liu, J. K., Jan, Y. N., Jan, L. Y. and Tjian, R. (1993). A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in *Drosophila*. *Nature* **361**, 557-61.

- D -

Daniely, Y., Dimitrova, D. D. and Borowiec, J. A. (2002). Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol* **22**, 6014-22.

Dantone, J. C., Quintin, S., Lakatos, L., Labouesse, M. and Tora, L. (2000). TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Mol Cell* **6**, 715-22.

Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J. B., Chatterjee, B., Cross, G. A. and Bellofatto, V. (2005). Trypanosomal TBP Functions with the Multisubunit Transcription Factor tSNAP To Direct Spliced-Leader RNA Gene Expression. *Mol Cell Biol* **25**, 7314-22.

Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D. and Asturias, F. A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* **10**, 409-15.

Davison, B. L., Egly, J. M., Mulvihill, E. R. and Chambon, P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* **301**, 680-6.

Dean, N. and Berk, A. J. (1987). Separation of TFIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res* **15**, 9895-907.

Dundr, M. and Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* **356**, 297-310.

Dundr, M., Misteli, T. and Olson, M. O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* **150**, 433-46.

Dworetzky, S. I., Fey, E. G., Penman, S., Lian, J. B., Stein, J. L. and Stein, G. S. (1990). Progressive changes in the protein composition of the nuclear matrix during rat osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4605-9.

- E -

Eichler, D. C. and Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**, 197-239.

Emami, K. H., Jain, A. and Smale, S. T. (1997). Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev* **11**, 3007-19.

Evans, R., Fairley, J. A. and Roberts, S. G. (2001). Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev* **15**, 2945-9.

- F -

Fabunmi, R. P., Wigley, W. C., Thomas, P. J. and DeMartino, G. N. (2001). Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* **114**, 29-36.

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**, 6697-705.

Felton-Edkins, Z. A., Fairley, J. A., Graham, E. L., Johnston, I. M., White, R. J. and Scott, P. H. (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *Embo J* **22**, 2422-32.

Fey, E. G., Krochmalnic, G. and Penman, S. (1986). The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol* **102**, 1654-65.

Fey, E. G. and Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 121-5.

Filipowicz, W. and Pogacic, V. (2002). Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 319-27.

Forget, D., Langelier, M. F., Therien, C., Trinh, V. and Coulombe, B. (2004). Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIE in initiation mechanisms. *Mol Cell Biol* **24**, 1122-31.

Frit, P., Kwon, K., Coin, F., Auriol, J., Dubaele, S., Salles, B. and Egly, J. M. (2002). Transcriptional activators stimulate DNA repair. *Mol Cell* **10**, 1391-401.

- G -

Geiger, J. H., Hahn, S., Lee, S. and Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science* **272**, 830-6.

Geisberg, J. V., Moqtaderi, Z., Kuras, L. and Struhl, K. (2002). Mot1 associates with transcriptionally active promoters and inhibits association of NC2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**, 8122-34.

Gerace, L. and Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 335-74.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H. and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 192-6.

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**, 1876-82.

Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N. and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* **421**, 290-4.

Gubitz, A. K., Feng, W. and Dreyfuss, G. (2004). The SMN complex. *Exp Cell Res* **296**, 51-6.

Gumbs, O. H., Campbell, A. M. and Weil, P. A. (2003). High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex: implications for TAF-independent transcription. *Embo J* **22**, 3131-41.

- H -

Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 394-403.

Handwerker, K. E., Cordero, J. A. and Gall, J. G. (2005). Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Mol Biol Cell* **16**, 202-11.

Hannan, K. M., Hannan, R. D., Smith, S. D., Jefferson, L. S., Lun, M. and Rothblum, L. I. (2000). Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* **19**, 4988-99.

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.

He, D. C., Nickerson, J. A. and Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol* **110**, 569-80.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S. and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* **2**, 43-53.

Hernandez-Verdun, D. and Gautier, T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**, 179-85.

Hernandez-Verdun, D. and Louvet, E. (2004). [The nucleolus: structure, functions, and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* **20**, 37-44.

Hobbs, N. K., Bondareva, A. A., Barnett, S., Capecchi, M. R. and Schmidt, E. E. (2002). Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental beta2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell* **110**, 43-54.

Hochheimer, A. and Tjian, R. (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev* **17**, 1309-20.

Hochheimer, A., Zhou, S., Zheng, S., Holmes, M. C. and Tjian, R. (2002). TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in Drosophila. *Nature* **420**, 439-45.

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**, 356-9.

Hoiby, T., Mitsiou, D. J., Zhou, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Stunnenberg, H. G. (2004). Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA. *Embo J* **23**, 3083-91.

Holmes, M. C. and Tjian, R. (2000). Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1. *Science* **288**, 867-70.

Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Heath, H., Mullenders, L. H., van Driel, R., Hoeijmakers, J. H., Vermeulen, W. and Houtsmuller, A. B. (2002). Rapid switching of TFIID between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Mol Cell* **10**, 1163-74.

Howe, J. G. and Shu, M. D. (1989). Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* **57**, 825-34.

Hu, P., Wu, S. and Hernandez, N. (2003). A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol Cell* **12**, 699-709.

- I -

Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J. M. and Grummt, I. (2002). TFIID plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**, 297-306.

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**, 689-92.

- J -

Jallow, Z., Jacobi, U. G., Weeks, D. L., Dawid, I. B. and Veenstra, G. J. (2004). Specialized and redundant roles of TBP and a vertebrate-specific TBP paralog in embryonic gene regulation in Xenopus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13525-30.

Jarrous, N., Wolenski, J. S., Wesolowski, D., Lee, C. and Altman, S. (1999). Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P. *J Cell Biol* **146**, 559-72.

Jiang, Y. and Gralla, J. D. (1993). Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase II transcription in vitro. *Mol Cell Biol* **13**, 4572-7.

Johnson, F. B., Marciniak, R. A. and Guarente, L. (1998). Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 332-8.

Johnson, K. M. and Carey, M. (2003). Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. *Curr Biol* **13**, 772-7.

Johnson, S. A., Dubeau, L., Kawalek, M., Dervan, A., Schonthal, A. H., Dang, C. V. and Johnson, D. L. (2003a). Increased expression of TATA-binding protein, the central transcription factor, can contribute to oncogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 3043-51.

Johnson, S. A., Dubeau, L., White, R. J. and Johnson, D. L. (2003b). The TATA-binding protein as a regulator of cellular transformation. *Cell Cycle* **2**, 442-4.

Juo, Z. S., Kassavetis, G. A., Wang, J., Geiduschek, E. P. and Sigler, P. B. (2003). Crystal structure of a transcription factor IIIB core interface ternary complex. *Nature* **422**, 534-9.

- K -

Kadonaga, J. T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* **34**, 259-64.

Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr., Umesono, K., Warrell, R. P., Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E. and Evans, R. M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**, 663-74.

Kaltenbach, L., Horner, M. A., Rothman, J. H. and Mango, S. E. (2000). The TBP-like factor CeTLF is required to activate RNA polymerase II transcription during *C. elegans* embryogenesis. *Mol Cell* **6**, 705-13.

Kamada, K., De Angelis, J., Roeder, R. G. and Burley, S. K. (2001a). Crystal structure of the C-terminal domain of the RAP74 subunit of human transcription factor IIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3115-20.

Kamada, K., Shu, F., Chen, H., Malik, S., Stelzer, G., Roeder, R. G., Meisterernst, M. and Burley, S. K. (2001b). Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* **106**, 71-81.

Kaufmann, J., Verrijzer, C. P., Shao, J. and Smale, S. T. (1996). CIF, an essential cofactor for TFIID-dependent initiator function. *Genes Dev* **10**, 873-86.

Kelly, W. G., Dahmus, M. E. and Hart, G. W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* **268**, 10416-24.

Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Classon, M., Dyson, N. and Harlow, E. (2000). Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* **14**, 2855-68.

Kettenberger, H., Armache, K. J. and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* **114**, 347-57.

Khrapunov, S., Pastor, N. and Brenowitz, M. (2002). Solution structural studies of the *Saccharomyces cerevisiae* TATA binding protein (TBP). *Biochemistry* **41**, 9559-71.

Kim, T. K., Ebright, R. H. and Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**, 1418-22.

Kim, T. K., Hashimoto, S., Kelleher, R. J., 3rd, Flanagan, P. M., Kornberg, R. D., Horikoshi, M. and Roeder, R. G. (1994). Effects of activation-defective TBP mutations on transcription initiation in yeast. *Nature* **369**, 252-5.

Kim, T. K., Lagrange, T., Wang, Y. H., Griffith, J. D., Reinberg, D. and Ebright, R. H. (1997). Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12268-73.

Kimura, M., Suzuki, H. and Ishihama, A. (2002). Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II. *Mol Cell Biol* **22**, 1577-88.

Kiselev, E. (2003). Nuclear pore complexes and Cajal bodies in *Xenopus*. *Nat Cell Biol* **5**, 193.

Klejman, M. P., Pereira, L. A., van Zeeburg, H. J., Gilfillan, S., Meisterernst, M. and Timmers, H. T. (2004). NC2alpha interacts with BTAF1 and stimulates its ATP-dependent association with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* **24**, 10072-82.

Koike, H., Kawashima-Ohya, Y., Yamasaki, T., Clowney, L., Katsuya, Y. and Suzuki, M. (2004). Origins of protein stability revealed by comparing crystal structures of TATA binding proteins. *Structure (Camb)* **12**, 157-68.

Koleske, A. J. and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**, 466-9.

Komarnitsky, P., Cho, E. J. and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**, 2452-60.

Kong, S. E., Kobor, M. S., Krogan, N. J., Somesh, B. P., Sogaard, T. M., Greenblatt, J. F. and Svejstrup, J. Q. (2005). Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem* **280**, 4299-306.

Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C. and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* **14**, 387-94.

Kuhn, A., Vente, A., Doree, M. and Grummt, I. (1998). Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol* **284**, 1-5.

Kutach, A. K. and Kadonaga, J. T. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* **20**, 4754-64.

- L -

Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* **12**, 34-44.

Lamond, A. I. and Spector, D. L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605-12.

Lavigne, A. C., Gangloff, Y. G., Carre, L., Mengus, G., Birck, C., Poch, O., Romier, C., Moras, D. and Davidson, I. (1999). Synergistic transcriptional activation by TATA-binding protein and hTAFII28 requires specific amino acids of the hTAFII28 histone fold. *Mol Cell Biol* **19**, 5050-60.

Lee, M. and Struhl, K. (1995). Mutations on the DNA-binding surface of TATA-binding protein can specifically impair the response to acidic activators in vivo. *Mol Cell Biol* **15**, 5461-9.

Lee, M. and Struhl, K. (2001). Multiple functions of the nonconserved N-terminal domain of yeast TATA-binding protein. *Genetics* **158**, 87-93.

Lee, M. G. and Van der Ploeg, L. H. (1997). Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annu Rev Microbiol* **51**, 463-89.

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**, 1166-75.

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**, 3424-33.

Leurent, C., Sanders, S. L., Demeny, M. A., Garbett, K. A., Ruhlmann, C., Weil, P. A., Tora, L. and Schultz, P. (2004). Mapping key functional sites within yeast TFIID. *Embo J* **23**, 719-27.

Lewis, B. A., Kim, T. K. and Orkin, S. H. (2000). A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7172-7.

Lewis, B. A. and Reinberg, D. (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci* **116**, 3667-75.

Liebhaber, S. A., Wolf, S. and Schlessinger, D. (1978). Differences in rRNA metabolism of primary and SV40-transformed human fibroblasts. *Cell* **13**, 121-7.

Lin, Y. C., Choi, W. S. and Gralla, J. D. (2005). TFIID XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nat Struct Mol Biol.*

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**, 573-83.

Lomvardas, S. and Thanos, D. (2002). Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell* **110**, 261-71.

- M -

Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T. and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* **30**, 329-34.

Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S. and Lee, W. H. (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 418-22.

Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27.

Marco, E., Garcia-Nieto, R. and Gago, F. (2003). Assessment by molecular dynamics simulations of the structural determinants of DNA-binding specificity for transcription factor Sp1. *J Mol Biol* **328**, 9-32.

Martianov, I., Brancorsini, S., Gansmuller, A., Parvinen, M., Davidson, I. and Sassone-Corsi, P. (2002a). Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development* **129**, 945-55.

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**, 509-15.

Martianov, I., Viville, S. and Davidson, I. (2002b). RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science* **298**, 1036-9.

Martindale, J. L. and Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**, 1-15.

Martinez, E., Zhou, Q., L'Etoile, N. D., Oelgeschlager, T., Berk, A. J. and Roeder, R. G. (1995). Core promoter-specific function of a mutant transcription factor TFIID defective in TATA-box binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11864-8.

Mattern, K. A., Humbel, B. M., Muijsers, A. O., de Jong, L. and van Driel, R. (1996). hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells. *J Cell Biochem* **62**, 275-89.

- Maul, G. G.** (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* **20**, 660-7.
- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P. and Ishov, A. M.** (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* **129**, 278-87.
- Mayer, C., Bierhoff, H. and Grummt, I.** (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**, 933-41.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S. and Bentley, D. L.** (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11**, 3306-18.
- Meier, J., Campbell, K. H., Ford, C. C., Stick, R. and Hutchison, C. J.** (1991). The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* **98** (Pt 3), 271-9.
- Mengus, G., Fadloun, A., Kobi, D., Thibault, C., Perletti, L., Michel, I. and Davidson, I.** (2005). TAF4 inactivation in embryonic fibroblasts activates TGFbeta signalling and autocrine growth. *Embo J*.
- 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**, 1381-95.
- Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A. and Tora, L.** (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *Embo J* **18**, 4823-34.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H. and Severinov, K.** (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 892-7.
- Mitchell, P. J. and Tjian, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-8.
- Mittal, V. and Hernandez, N.** (1997). Role for the amino-terminal region of human TBP in U6 snRNA transcription. *Science* **275**, 1136-40.
- 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. et al.** (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261-70.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H. and Leutz, A.** (2004). Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* **13**, 241-50.
- Moir, R. D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R. D.** (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* **125**, 1201-12.
- Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H. J. and Dirks, R. W.** (2004). Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J Cell Biol* **165**, 191-202.
- Moore, P. B. and Steitz, T. A.** (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* **418**, 229-35.
- Muchir, A. and Worman, H. J.** (2004). The nuclear envelope and human disease. *Physiology (Bethesda)* **19**, 309-14.
- Muldrow, T. A., Campbell, A. M., Weil, P. A. and Auble, D. T.** (1999). MOT1 can activate basal transcription in vitro by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites. *Mol Cell Biol* **19**, 2835-45.

Muller, F., Lakatos, L., Dantone, J., Strahle, U. and Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr Biol* **11**, 282-7.

- N -

Nakadai, T., Shimada, M., Shima, D., Handa, H. and Tamura, T. A. (2004). Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J Biol Chem* **279**, 7447-55.

Nakatani, Y., Horikoshi, M., Brenner, M., Yamamoto, T., Besnard, F., Roeder, R. G. and Freese, E. (1990). A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIID. *Nature* **348**, 86-8.

Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* **111**, 2247-59.

Nickerson, J. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* **114**, 463-74.

Nikolov, D. B. and Burley, S. K. (1994). 2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP). *Nat Struct Biol* **1**, 621-37.

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**, 4862-7.

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**, 119-28.

Nikolov, D. B., Hu, S. H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G. and Burley, S. K. (1992). Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* **360**, 40-6.

Nili, E., Cojocaru, G. S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N. et al. (2001). Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci* **114**, 3297-307.

- O -

O'Brien, T. and Tjian, R. (1998). Functional analysis of the human TAFII250 N-terminal kinase domain. *Mol Cell* **1**, 905-11.

O'Brien, T. and Tjian, R. (2000). Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2456-61.

O'Shea-Greenfield, A. and Smale, S. T. (1992). Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* **267**, 1391-402.

Oettel, S., Hartel, F., Kober, I., Iben, S. and Seifart, K. H. (1997). Human transcription factors IIIC2, IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2440-7.

Ogg, S. C. and Lamond, A. I. (2002). Cajal bodies and coilin--moving towards function. *J Cell Biol* **159**, 17-21.

Ohler, U., Liao, G. C., Niemann, H. and Rubin, G. M. (2002). Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0087.

Orlicky, S. M., Tran, P. T., Sayre, M. H. and Edwards, A. M. (2001). Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of RNA polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J Biol Chem* **276**, 10097-102.

Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y. and Sakiyama, S. (1994). Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene* **9**, 2649-53.

- P -

Palancade, B. and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* **270**, 3859-70.

Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T. and Kim, Y. J. (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell* **8**, 9-19.

Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S. and Dreyfuss, G. (2002). The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 305-12.

Pereira, L. A., Klejman, M. P. and Timmers, H. T. (2003). Roles for BTAf1 and Mot1p in dynamics of TATA-binding protein and regulation of RNA polymerase II transcription. *Gene* **315**, 1-13.

Perletti, L., Kopf, E., Carre, L. and Davidson, I. (2001). Coordinate regulation of RARgamma2, TBP, and TAFII135 by targeted proteolysis during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *BMC Mol Biol* **2**, 4.

Persengiev, S. P., Zhu, X., Dixit, B. L., Maston, G. A., Kittler, E. L. and Green, M. R. (2003). TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14887-91.

Pham, A. D. and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* **289**, 2357-60.

Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J. R. and Lamond, A. I. (2000). In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol* **151**, 1561-74.

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**, 1847-58.

Poon, D., Campbell, A. M., Bai, Y. and Weil, P. A. (1994). Yeast Taf170 is encoded by MOT1 and exists in a TATA box-binding protein (TBP)-TBP-associated factor complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* **269**, 23135-40.

Prather, D. M., Larschan, E. and Winston, F. (2005). Evidence that the elongation factor TFIIIS plays a role in transcription initiation at GAL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**, 2650-9.

Purdy, J. E., Pho, L. T., Mann, B. J. and Petri, W. A., Jr. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 91-103.

- Q -

Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J. C. and de The, H. (1998). PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* **20**, 259-65.

- R -

Rabenstein, M. D., Zhou, S., Lis, J. T. and Tjian, R. (1999). TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4791-6.

Ramón y Cajal, S. (1903). Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Invest. Biol.* **2**, 211-223.

Ranish, J. A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E. C., Li, X. J., Eng, J. and Aebersold, R. (2004). Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIIH. *Nat Genet* **36**, 707-13.

Ranish, J. A., Yudkovsky, N. and Hahn, S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev* **13**, 49-63.

Reddy, P. and Hahn, S. (1991). Dominant negative mutations in yeast TFIID define a bipartite DNA-binding region. *Cell* **65**, 349-57.

Reeder, R. H. (1999). Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 293-327.

Reese, J. C. and Green, M. R. (2001). Genetic analysis of TAF68/61 reveals links to cell cycle regulators. *Yeast* **18**, 1197-205.

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**, 341-51.

Robinson, M. M., Yatherajam, G., Ranallo, R. T., Bric, A., Paule, M. R. and Stargell, L. A. (2005). Mapping and functional characterization of the TAF11 interaction with TFIIA. *Mol Cell Biol* **25**, 945-57.

Roeder, R. G., Schwartz, L. B. and Sklar, V. E. (1976). Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Symp Soc Dev Biol*, 29-52.

Roussel, P., Andre, C., Comai, L. and Hernandez-Verdun, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**, 235-46.

Roy, A. L. (2001). Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* **274**, 1-13.

Ruan, J. P., Arhin, G. K., Ullu, E. and Tschudi, C. (2004). Functional characterization of a Trypanosoma brucei TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol* **24**, 9610-8.

Rudge, T. L. and Johnson, L. F. (1999). Inactivation of MED-1 elements in the TATA-less, initiator-less mouse thymidylate synthase promoter has no effect on promoter strength or the complex pattern of transcriptional start sites. *J Cell Biochem* **73**, 90-6.

Ruggero, D., Wang, Z. G. and Pandolfi, P. P. (2000). The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays* **22**, 827-35.

Russell, J. and Zomerdijs, J. C. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**, 87-96.

- S -

Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B. M. and Zink, D. (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* **146**, 1211-26.

Sakonju, S., Bogenhagen, D. F. and Brown, D. D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* **19**, 13-25.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybilov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P. et al. (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* **14**, 685-91.

- Sauer, F. and Tjian, R.** (1997). Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, Drosophila, and man. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 176-81.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D. and Egly, J. M.** (2000). Molecular structure of human TFIIH. *Cell* **102**, 599-607.
- Schwartz, T. U.** (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 221-6.
- Seto, E., Shi, Y. and Shenk, T.** (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature* **354**, 241-5.
- Setzer, D. R., Menezes, S. R., Del Rio, S., Hung, V. S. and Subramanyan, G.** (1996). Functional interactions between the zinc fingers of Xenopus transcription factor IIIA during 5S rRNA binding. *Rna* **2**, 1254-69.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A. and Brown, M.** (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-52.
- 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**, 206-19.
- Sharma, D. and Fondell, J. D.** (2002). Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7934-9.
- Shaw, P. J. and Jordan, E. G.** (1995). The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 93-121.
- Shimada, M., Nakadai, T. and Tamura, T. A.** (2003). TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF) negatively regulates cell cycle progression and is required for the stress-mediated G(2) checkpoint. *Mol Cell Biol* **23**, 4107-20.
- Shumaker, D. K., Kuczmarski, E. R. and Goldman, R. D.** (2003). The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 358-66.
- Sinclair, D. A. and Guarente, L.** (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033-42.
- Sinclair, D. A., Mills, K. and Guarente, L.** (1997). Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs1 mutants. *Science* **277**, 1313-6.
- Soutoglou, E. and Talianidis, I.** (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* **295**, 1901-4.
- Spann, T. P., Goldman, A. E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R. D.** (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* **156**, 603-8.
- Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R. and Goldman, R. D.** (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* **136**, 1201-12.
- Spencer, J. V. and Arndt, K. M.** (2002). A TATA binding protein mutant with increased affinity for DNA directs transcription from a reversed TATA sequence in vivo. *Mol Cell Biol* **22**, 8744-55.
- Stargell, L. A. and Struhl, K.** (1995). The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators in vivo. *Science* **269**, 75-8.
- Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I. and Moss, T.** (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**, 1063-73.
- Stick, R. and Hausen, P.** (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 191-200.

Strubin, M. and Struhl, K. (1992). Yeast and human TFIID with altered DNA-binding specificity for TATA elements. *Cell* **68**, 721-30.

Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., Ota, T., Isogai, T., Tanaka, T., Nakamura, Y. et al. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* **11**, 677-84.

Swift, H. (1959). Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp Biol* **12**, 134-52.

- T -

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**, 1058-62.

Takada, S., Lis, J. T., Zhou, S. and Tjian, R. (2000). A TRF1:BRF complex directs Drosophila RNA polymerase III transcription. *Cell* **101**, 459-69.

Tan, S., Hunziker, Y., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1996). Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature* **381**, 127-51.

Tang, H., Sun, X., Reinberg, D. and Ebright, R. H. (1996). Protein-protein interactions in eukaryotic transcription initiation: structure of the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1119-24.

Tansey, W. P. and Herr, W. (1997). Selective use of TBP and TFIIB revealed by a TATA-TBP-TFIIB array with altered specificity. *Science* **275**, 829-31.

Teichmann, M. and Seifart, K. H. (1995). Physical separation of two different forms of human TFIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *Embo J* **14**, 5974-83.

Teichmann, M., Wang, Z., Martinez, E., Tjernberg, A., Zhang, D., Vollmer, F., Chait, B. T. and Roeder, R. G. (1999). Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13720-5.

Thiry, M. (1995). The interchromatin granules. *Histol Histopathol* **10**, 1035-45.

Thuault, S., Gangloff, Y. G., Kirchner, J., Sanders, S., Werten, S., Romier, C., Weil, P. A. and Davidson, I. (2002). Functional analysis of the TFIID-specific yeast TAF4 (yTAF(II)48) reveals an unexpected organization of its histone-fold domain. *J Biol Chem* **277**, 45510-7.

Timmers, H. T., Meyers, R. E. and Sharp, P. A. (1992). Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8140-4.

Tora, L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* **16**, 673-5.

- U -

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**, 2435-48.

Upadhyaya, A. B., Khan, M., Mou, T. C., Junker, M., Gray, D. M. and DeJong, J. (2002). The germ cell-specific transcription factor ALF. Structural properties and stabilization of the TATA-binding protein (TBP)-DNA complex. *J Biol Chem* **277**, 34208-16.

- V -

Veenstra, G. J., Weeks, D. L. and Wolffe, A. P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* **290**, 2312-5.

Verrijzer, C. P., Chen, J. L., Yokomori, K. and Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* **81**, 1115-25.

Visintin, R. and Amon, A. (2000). The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 372-7.

Vogelstein, B., Pardoll, D. M. and Coffey, D. S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell* **22**, 79-85.

- W -

Walker, S. S., Shen, W. C., Reese, J. C., Apone, L. M. and Green, M. R. (1997). Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell* **90**, 607-14.

Washburn, M. P., Wolters, D. and Yates, J. R., 3rd. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7.

Wassarman, D. A. and Sauer, F. (2001). TAF(II)250: a transcription toolbox. *J Cell Sci* **114**, 2895-902.

Watanabe, T., Hayashi, K., Tanaka, A., Furumoto, T., Hanaoka, F. and Ohkuma, Y. (2003). The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **23**, 2914-26.

Weil, P. A., Luse, D. S., Segall, J. and Roeder, R. G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* **18**, 469-84.

Werten, S., Mitschler, A., Romier, C., Gangloff, Y. G., Thuault, S., Davidson, I. and Moras, D. (2002). Crystal structure of a subcomplex of human transcription factor TFIID formed by TATA binding protein-associated factors hTAF4 (hTAF(II)135) and hTAF12 (hTAF(II)20). *J Biol Chem* **277**, 45502-9.

Weser, S., Gruber, C., Hafner, H. M., Teichmann, M., Roeder, R. G., Seifart, K. H. and Meissner, W. (2004). Transcription factor (TF)-like nuclear regulator, the 250-kDa form of Homo sapiens TFIIB", is an essential component of human TFIIC1 activity. *J Biol Chem* **279**, 27022-9.

West, M. L. and Corden, J. L. (1995). Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. *Genetics* **140**, 1223-33.

White, R. J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 69-78.

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**, 187-91.

Willis, I. M. (2002). A universal nomenclature for subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB. *Genes Dev* **16**, 1337-8.

Woychik, N. A. and Young, R. A. (1989). RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol Cell Biol* **9**, 2854-9.

- X -

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**, 316-22.

- Y -

Yan, Q., Moreland, R. J., Conaway, J. W. and Conaway, R. C. (1999). Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem* **274**, 35668-75.

Yoshinaga, S. K., Boulanger, P. A. and Berk, A. J. (1987). Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3585-9.

Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H. J., Schutz, G. and Grummt, I. (2005). Genetic Inactivation of the Transcription Factor TIF-IA Leads to Nucleolar Disruption, Cell Cycle Arrest, and p53-Mediated Apoptosis. *Mol Cell* **19**, 77-87.

Yudkovsky, N., Ranish, J. A. and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**, 225-9.

- Z -

Zehring, W. A., Lee, J. M., Weeks, J. R., Jokerst, R. S. and Greenleaf, A. L. (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3698-702.

Zenzie-Gregory, B., Khachi, A., Garraway, I. P. and Smale, S. T. (1993). Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol Cell Biol* **13**, 3841-9.

Zhang, C., Comai, L. and Johnson, D. L. (2005). PTEN Represses RNA Polymerase I Transcription by Disrupting the SL1 Complex. *Mol Cell Biol* **25**, 6857-6868.

Zhang, D., Penttila, T. L., Morris, P. L. and Roeder, R. G. (2001). Cell- and stage-specific high-level expression of TBP-related factor 2 (TRF2) during mouse spermatogenesis. *Mech Dev* **106**, 203-5.

Zhao, X., Schramm, L., Hernandez, N. and Herr, W. (2003). A shared surface of TBP directs RNA polymerase II and III transcription via association with different TFIIB family members. *Mol Cell* **11**, 151-61.

Zhong, S., Zhang, C. and Johnson, D. L. (2004). Epidermal growth factor enhances cellular TATA binding protein levels and induces RNA polymerase I- and III-dependent gene activity. *Mol Cell Biol* **24**, 5119-29.

Zimber, A., Nguyen, Q. D. and Gespach, C. (2004). Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal* **16**, 1085-104.

Zink, D., Fischer, A. H. and Nickerson, J. A. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 677-87.

Zurita, M. and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIF complex. *Trends Genet* **19**, 578-84.

SUMMARY.

The initiation of transcription by RNA polymerase II requires the formation of a multiprotein complex at the basal promoter around the mRNA start site. In addition to polymerase II, this complex comprises the general transcription factors TFIIA, B, D, E, F and H and the mediator complex. TFIID consists of the TATA binding protein, TBP and 13-14 TBP-associated factors, TAFs. TBP has been shown to be involved in transcription by all three nuclear RNA polymerases, however this universal requirement has been called into question by the discovery of the TBP-related factors TRF1, 2 and 3.

Previous studies in different model organisms have shown that TRF2 is involved in embryogenesis and in spermatogenesis, but several questions concerning its function remained subject to debate. During my thesis, I have studied the function and intracellular localization of TRF2. These experiments show that TRF2 localises to the nucleolus in HeLa and Cos cells throughout the cell cycle, while TBP is nucleoplasmic and nucleolar. TRF2 is released from the nucleolus by oxidative stress, but not by the other tested apoptotic or mitogenic stimuli. TRF2 is also rapidly released from the nucleolus by arrest of pol I transcription or treatment of the nuclei by RNase A. In contrast, in NIH 3T3 cells, TRF2 is nucleoplasmic indicating that nucleolar localization is cell specific. Constitutive expression of TRF2 in 3T3 cells results in reduced proliferation and an increase in the S-phase population. Our results do not support the idea that TRF2 is cytoplasmic and imported into the nucleus to regulate the G2/M checkpoint. Together our results rather suggest that one or several RNAs, perhaps snoRNAs, direct nucleolar localisation of TRF2 where it is released in response to oxidative, but not other stress stimuli.

In a second project, we have developed a novel system to evaluate the effect of TBP mutations *in vivo*. Previous studies have generated a large collection of amino acid substitutions on the surface of TBP. The effect of these mutations has been evaluated *in vitro* binding assays with its known partners and *in vitro* transcription assays with pol I, II and III promoters. However, the effect of these mutations has not been studied *in vivo* in living cells. We have generated $tbpl^{lox/-}$ mouse embryonic fibroblasts in which TBP can be inactivated by expression of the Cre recombinase. The $tbpl^{-/-}$ fibroblasts die rapidly, but the loss of endogenous mouse TBP can be complemented by expression of wild-type human TBP. We have tested the ability of various TBP mutants to complement for the loss of endogenous TBP in either transient or stable expression assays where we have generated viable $tbpl^{-/-}$ cell lines expressing mutant TBPs. Our results show that TBP mutants which show severely compromised function *in vitro* can support cell viability. However, cells expressing several mutants show defective proliferation. This system offers a novel approach to better understand the function of TBP *in vivo*.

RESUME.

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II requiert la formation d'un complexe multiprotéique sur l'ADN. Ce complexe comprend, outre la pol.II, les facteurs généraux de transcription TFIIA, -B, -D, -E, -F et -H ainsi que le médiateur. TFIID est constitué par la TATA Binding Protéine (TBP) et 13 à 14 facteurs associés (TAFs). TBP participant à la transcription par les trois ARN polymérases nucléaires, il est souvent considéré comme le facteur « universel ». Le caractère universel de TBP a été remis en cause par la découverte de TRF1, TRF2 et TRF3, des paralogues de TBP.

Des études antérieures, dans différents organismes modèles, ont montré que TRF2 est impliqué dans l'embryogenèse et la spermatogenèse. Mais ses fonctions précises sont toujours incertaines. Lors de mes travaux de thèse, j'ai étudié la fonction et la localisation cellulaire de TRF2.

Alors que TBP peut être identifié dans tous les compartiments nucléaires, ceci dans toutes les lignées somatiques examinées, TRF2 présente une localisation variable. Dans les cellules HeLa et Cos, ce facteur est concentré dans les nucléoles tout au long du cycle cellulaire. TRF2 est relocalisé dans le nucléoplasme suite à un stress oxydatif et non suite aux traitements apoptotiques ou mitogéniques testés. Un traitement des noyaux par la RNase A ou l'arrêt de la transcription par la pol I provoquent également une relocalisation rapide de TRF2 vers le nucléoplasme. Dans les cellules NIH 3T3, la protéine TRF2 adopte une localisation nucléoplasmique. L'expression constitutive de TRF2 réduit la prolifération et augmente la proportion de cellules en phase S. Nos résultats infirment l'hypothèse d'un passage de TRF2 du cytoplasme au noyau pour réguler la transition G2/M. L'ensemble de nos observations suggère qu'un ou plusieurs ARN(s), probablement du type snoARN, maintient TRF2 dans le nucléole d'où il est libéré lors d'un stress oxydatif.

Dans un deuxième projet, nous avons développé un système d'étude *in vivo* des mutations de TBP. Nous avons généré des fibroblastes murins embryonnaires $tbpl^{lox/-}$, dans lesquels TBP peut être invalidé par une activité recombinase Cre. L'absence de TBP s'avère létale pour ces cellules ; elle peut néanmoins être compensée par le TBP humain en transfection transitoire ou stable. Des tests de complémentation ont donc pu être réalisés pour différents mutants du TBP humain, jusqu'alors seulement caractérisés *in vitro*. La plupart des résidus rapportés comme cruciaux pour l'interaction de TBP avec ses partenaires ne semblent pas nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire. L'expression de certains mutants entraîne toutefois une diminution de la prolifération cellulaire. Ce système offre une nouvelle approche pour mieux comprendre les fonctions de TBP *in vivo*.